Nº D'ORDRE au C.N.R.S.
AO 7480

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE ROUEN

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Joseph TOUTAIN

CONTRIBUTION A L'ETUDE EXPERIMENTALE DE QUELQUES ASPECTS DES VARIATIONS SAISONNIERES DE LA THYROIDE DE LA CALCEMIE ET DU VOLUME ERYTHROCYTAIRE DU SANG CHEZ *Rana esculenta* L.

Soutenue le 22 Septembre 1972

MM P. REY,	Professeur à la Faculté des Sciences de Rouen	Président
H. CHALOPIN,	Professeur à la Faculté des Sciences de Rouen	Examinateurs
Mme. E. LEGRAND,	Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Rouen	
M. P. BRIEN,	Correspondant de l'Académie des Sciences Docteur *honoris causa* de l'Université de Rouen	Invité

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544705_0011

Nº D'ORDRE au C.N.R.S.
AO 7480

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE ROUEN

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Joseph TOUTAIN

CONTRIBUTION A L'ETUDE EXPERIMENTALE DE QUELQUES ASPECTS DES VARIATIONS SAISONNIERES DE LA THYROIDE DE LA CALCEMIE ET DU VOLUME ERYTHROCYTAIRE DU SANG CHEZ *Rana esculenta* L.

Soutenue le 22 Septembre 1972

MM P. REY,	Professeur à la Faculté des Sciences de Rouen	Président
H. CHALOPIN,	Professeur à la Faculté des Sciences de Rouen	Examinateurs
Mme. E. LEGRAND,	Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Rouen	
M. P. BRIEN,	Correspondant de l'Académie des Sciences Docteur *honoris causa* de l'Université de Rouen	Invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ACADEMIE DE ROUEN
FACULTE DES SCIENCES

Année scolaire 1971-1972

PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FACULTE DES SCIENCES

Doyen Honoraire..... A. COLOMBANI
Doyen..... P. ROLLIN

Mlle	COUILLAUD Edith	Professeur Honoraire
MM.	BACHELET Maurice	Professeur (Chimie)
	BOULLARD Bernard	Professeur (Biologie Végétale)
	BOURION Georges	Professeur (Mathématiques)
	COLOMBANI Antoine	Professeur (Physique)
	GRAF René	Professeur (Physique)
	HANSEL Georges	Professeur (Mathématiques)
	REY Pierre	Professeur (Biologie Animale)
	ROLLIN Paul	Professeur (Biologie Végétale)
	THELLIER Michel	Professeur (Biologie Végétale)
	VALENTIN Pierre	Professeur (Physique)
MM.	BACKES Michel	Professeur à titre personnel (Chimie)
	BOUIX Maurice	Professeur à titre personnel (Mathématiques)
Mme	ROUSSEAU Madeleine	Professeur à titre personnel (Physique)
M.	SELEGNY Eric	Professeur à titre personnel (Chimie)
Mme	WINOGRADZKI Judith	Professeur à titre personnel (Physique)
MM.	BOUAZIZ Roger	Professeur sans chaire (Chimie)
	CHALOPIN Henri	Professeur sans chaire (Biologie Animale)
	DUHAMEL Pierre	Professeur sans chaire (Chimie)
	GALLOT Jean	Professeur sans chaire (Physique)
	GRIBENSKI André	Professeur sans chaire (Biologie Animale)
	HAYMANN Pierre	Professeur sans chaire (Physique)
	HUET Pierre	Professeur sans chaire (Physique)

MM.	CHARPENTIER Jean	Maître de Conférences (Biologie Animale) (Psychophysiologie)
	COHEN Paul	Maître de Conférences (Biochimie, Biologie Végétale)
	DERRIDJ Makhlouf	Maître de Conférences (Mathématiques)
	FLEURY Maurice-Bernard	Maître de Conférences (Chimie)
	GOUAULT Jean	Maître de Conférences (Physique)
	HOMMERIL Pierre	Maître de Conférences (Géologie)
Mme	LEGRAND Emmanuelle	Maître de Conférences (Biologie Animale)
MM.	PEREZ	Maître de Conférences (Chimie)
	PETIT Jean-Luc	Maître de Conférences (Mathématiques)
	RAOULT Jean-Pierre	Maître de Conférences (Mathématiques)
	ROUGEE Paul	Maître de Conférences (Mathématiques)
Mme	SURIN Aline	Maître de Conférences (Mathématiques)
M.	UNANUE Ander	Maître de Conférences rattaché (Chimie)
M.	COMBRET Jean-Claude	Maître de Conférences (Chimie)
M.	A. GIRAULT	Attaché principal d'Administration

à ma femme

A V A N T - P R O P O S

Je ne saurais aborder ce travail sans exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur P. REY, Directeur du Laboratoire de Biologie Animale, qui m'a orienté vers un sujet qui répondait en tout à mes aspirations. L'intérêt qu'il a manifesté pour mes recherches, ses conseils bienveillants et ses encouragements ont été pour moi, plus d'une fois, d'un grand secours. Que ce mémoire lui soit un témoignage de ma grande reconnaissance.

Mes respectueux remerciements vont à Monsieur le Professeur H. CHALOPIN dont les critiques constructives et les conseils m'ont beaucoup aidé et qui a bien voulu juger ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame E. LEGRAND, Maître de Conférences, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce mémoire et pour la sympathie qu'elle me témoigne.

Monsieur le Professeur P. BRIEN, Correspondant de l'Académie des Sciences, a suivi mes recherches avec une rare bienveillance. La lecture de ses nombreux travaux n'a cessé de m'enthousiasmer. J'apprécie l'honneur qu'il a bien voulu me faire en participant à mon jury. Je l'en remercie profondément.

Je ne saurais oublier tous ceux qui, au laboratoire, ont facilité ce travail, en particulier Madame MARAIS et Mademoiselle LATIMIER.

J'exprime ma reconnaissance à la Fédération Départementale des Associations de Pêche et de Pisciculture de Seine-Maritime et à son Président, Monsieur CHABANON, pour leur aide matérielle.

Mes remerciements vont également au Service des Tirages dont le concours et la compétence ont permis la réalisation de ce mémoire.

La frappe de cette thèse a été effectuée sur une machine à écrire électrique "à sphère" IBM, mise gracieusement à ma disposition par l'intermédiaire de Monsieur WATER (IBM France) que je tiens à remercier.

S O M M A I R E

INTRODUCTION..... p. 1

CHAPITRE I - MATERIEL ET TECHNIQUES..... p. 4

MATERIEL..... p. 4

TECHNIQUES..... p. 6

A) Techniques d'élevage..... p. 6

B) Techniques expérimentales..... p. 11

1) Injections..... p. 11
a) Injection de solutions..... p. 11
b) Injection d'hypophyses..... p. 11

2) Anesthésie..... p. 14

3) Opérations..... p. 14
Thyroïdectomie..... p. 14
Hypophysectomie..... p. 16
Parathyroïdectomie..... p. 19
Castration..... p. 20

4) Histologie..... p. 20
Thyroïde..... p. 20
Hypophyse..... p. 26
Parathyroïde..... p. 27

5) Mesure du volume érythrocytaire..... p. 27

6) Biochimie..... p. 28
a) Dosage du calcium..... p. 28
b) Dosage du phosphore inorganique..... p. 31

CHAPITRE II - ACTION DE L'OBSCURITE ET DU FROID SUR LA GLANDE THYROIDE..... p. 32

A) Animaux témoins..... p. 35

B) Action de l'obscurité seule..... p. 36

1) Protocole expérimental..... p. 36

2) Résultats..... p. 36

3) Discussion..... p. 40

C) Action du froid..... p. 44

1) Protocole expérimental..... p. 44

2) Résultats..... p. 45

3) Discussion..... p. 56

CHAPITRE III - VARIATIONS DE LA CALCEMIE ET DE LA PHOSPHOREMIE ETUDE CORRELATIVE DE DIFFERENTS FACTEURS..... p. 60

A) Structure histologique et cytologique des parathyroïdes..... p. 62

B) Variations saisonnières de la teneur en calcium et en phosphore du plasma..... p. 67

1) Protocole expérimental..... p. 68

2) Résultats..... p. 68

3) Discussion..... p. 75

C) Action de l'obscurité et du froid sur le taux de calcium du plasma..... p. 75

1) Action de l'obscurité..... p. 75
a) Protocole expérimental..... p. 75
b) Résultats..... p. 75
c) Discussion..... p. 76

2) Action du froid..... p. 76
a) Protocole expérimental..... p. 76
b) Résultats..... p. 76

D) Influence de la parathyroïdectomie sur la calcémie..... p. 78

1) Protocole expérimental..... p. 79

2) Résultats..... p. 79

3) Discussion..... p. 85

E) Administration d'extraits parathyroïdiens..... p. 90

1) Protocole expérimental..... p. 91

2) Résultats..... p. 91

3) Discussion..... p. 98

F) Injection de vitamine D_3..... p. 103

1) Protocole expérimental..... p. 103

2) Résultats..... p. 104
a) Eau provenant d'un échangeur d'ions..... p. 104
b) Solution de chlorure de calcium à 1 %..... p. 104

3) Discussion..... p. 108

G) Injection d'E. D. T. A. Na_2..... p. 109

1) Protocole expérimental..... p. 110

2) Résultats..... p. 110
a) Injection de 5 ml de solution..... p. 110
b) Injection de 2,5 ml de solution..... p. 110
c) Injection de 1 ml de solution..... p. 110
d) Injection de 0,5 ml de solution..... p. 111
e) Injection de 0,5 ml de solution
d'E. D. T. A. toutes les 90 minutes..... p. 112
f) Grenouilles parathyroïdectomisées..... p. 112

3) Discussion..... p. 112

H) Action des oestrogènes..... p. 115

1) Protocole expérimental..... p. 115

2) Résultats..... p. 116

3) Discussion..... p. 116

I) Conclusion..... p. 117

CHAPITRE IV - VARIATIONS DU VOLUME ERYTHROCYTAIRE DU SANG..... p. 122

A) Variations annuelles..... p. 123

1) Protocole expérimental..... p. 123

2) Résultats..... p. 123

B) Influence de la ponte provoquée..... p. 126

1) Protocole expérimental..... p. 126

2) Résultats..... p. 127

CHAPITRE V - CONCLUSIONS GENERALES..... p. 132

BIBLIOGRAPHIE..... p. 136

On estimera peut-être, de prime abord, que j'ai traité là un sujet de trop mince importance. En un temps où la presse, chaque jour, annonce un nouvel exploit de la chirurgie cardiaque, ou quelque prouesse de l'astronautique, n'est-il pas un peu dérisoire de se pencher sur ..... une grenouille ? Que pouvons nous attendre d'une pareille étude ?

J. ROSTAND. 1971

I N T R O D U C T I O N

-=-=-=-=-=-

Tout être vivant est soumis, dans son milieu naturel aux influences multiples de ce qui l'entoure ; il est dépendant de la température de l'air, de l'eau ou du sol où il est implanté. Les conditions dans lesquelles un organisme vit, ne déterminent pas seulement sa distribution spatiale et chronologique, mais exercent également, dans beaucoup de cas, une influence directe sur lui.

Tous les facteurs provenant de l'environnement sont habituellement classés suivant leur origine : climatique, édaphique ou biotique. Les facteurs écologiques sont soumis à des variations périodiques, correspon-

dant aux rythmes cosmiques, nycthéméral ou saisonniers. Les organismes, adaptés à ces variations, ou bien les subissent en passant à l'état d'inactivité sous la dépendance immédiate des facteurs externes, ou bien s'y soustraient, soit par des migrations, soit en passant à l'état physiologique de dormance, état qui n'est plus sous la dépendance immédiate des facteurs externes. A époque fixe, des Poissons, des Amphibiens, des Oiseaux, des Mammifères entreprennent des migrations plus ou moins amples, corrélatives des saisons. Des organismes qui sont sédentaires présentent pour survivre aux saisons défavorables un certain nombre d'adaptations très particulières. De nombreux animaux échappent aux variations climatiques ou physiques du milieu en se cantonnant dans une "niche écologique" très stable : terriers, dont ils ne sortent que lorsque les conditions externes sont favorables.

Les variations périodiques d'états physiologiques sont, en dernière analyse, entretenues par les variations des facteurs externes. L'analyse des mécanismes de ces phénomènes, relève de la physiologie, mais les problèmes physiologiques qu'ils soulèvent ne peuvent être abordés indépendamment de leurs implications écologiques. Au contact des deux disciplines se constitue une écologie physiologique.

Ainsi la température, au moins chez les poïkilothermes, influence le métabolisme, Des phénomènes secondaires, résultant des variations de température, peuvent déclancher une série de modifications interdépendantes qui peuvent affecter à un degré plus ou moins élevé un être vivant. C'est ainsi que la toxicité de certaines substances peut se trouver notablement augmentée par une élévation de température.

Il en est de même qualitativement et quantitativement des variations de lumière. Non seulement les organismes sont sensibles à ces facteurs physiques caractéristiques de l'environnement, mais également à leurs variations.

Dès 1824, W. Edwards constate expérimentalement que la métamorphose est retardée ou empêchée chez les têtards de Grenouille placés dans l'obscurité. Aucun travail d'ensemble n'a été effectué sur l'écologie physiologique de *Rana esculenta* en ce qui concerne les thyroïdes,

les parathyroïdes et les variations corrélatives du sang. Quelques auteurs ont étudié, comme nous le verrons dans les chapitres suivants, les variations saisonnières de ces glandes et celles du sang chez d'autres espèces d'Amphibiens vivant le plus souvent dans un environnement différent de celui de *Rana esculenta*.

Grâce à des élevages faits dans des conditions aussi proches que possible de celles de la nature, j'ai donc cherché d'abord à compléter et à préciser les données des différents auteurs. Le deuxième chapitre de ce mémoire est consacré à la description des modifications histologiques de la thyroïde dans des conditions qui correspondent sensiblement à celles de l'hiver. Puis dans un troisième chapitre, j'ai étudié les modifications saisonnières de la calcémie et de la phosphérémie et leurs variations sous l'action de différents facteurs. Cette étude des variations biochimiques du sang m'a conduit à remarquer une périodicité saisonnière du volume érythrocytaire du sang que le quatrième et dernier chapitre de ce travail aborde. Un certain nombre d'hypothèses, outils de travail pour des expérimentations futures complètent ces chapitres.

C H A P I T R E I

-=-=-=-=-

MATERIEL ET TECHNIQUES

MATERIEL

Nos recherches ont été effectuées sur des Grenouilles vertes provenant de France (région vendéenne) ou de Bulgarie. Les premières appartenaient au type même de l'espèce *Rana esculenta esculenta* L, les autres à la sous-espèce *hungarica*, appelée encore *Rana esculenta ridibunda* Boulgr. qui se caractérise par une taille beaucoup plus grande, certains individus pouvant atteindre 12 à 15 centimètres, du museau à l'anus (Voitkevitch, 1961).

Rana esculenta habite les eaux douces stagnantes ou courantes, contrairement à *Rana temporaria* qui vit dans les endroits humides des prairies, des forêts à d'assez grandes distances de l'eau et, temporairement, dans les eaux douces.

La Grenouille verte se plaît dans les mares, les étangs, les fossés des marais, les ruisseaux garnis de végétaux. Elle est essentiellement aquatique ; toutefois, elle va sur les rives pour chercher de la nourriture, se reposer, mais à la moindre alerte, elle saute dans l'eau et plonge, revenant peu de temps après à la surface. Ses moeurs sont principalement crépusculaires et nocturnes. Pendant le jour, elle reste, soit à la surface de l'eau, cachée parmi les plantes ou se reposant sur une feuille flottante, soit dans le voisinage immédiat des eaux. Aux premiers froids de l'automne, habituellement en octobre ou novembre, elle se retire pour hiverner, dans un trou de la rive, et reprend sa vie active vers mars. Elle est très vorace. Sa nourriture se compose d'Insectes et de larves, de Vers, de Mollusques, de Crustacés, de jeunes Batraciens, etc. La femelle ne fait annuellement qu'une ponte d'environ dix mille oeufs, qui a lieu généralement en avril ou mai.

TECHNIQUES

A) TECHNIQUES D'ELEVAGE

Les Grenouilles sont élevées dans une mare, puis au laboratoire, si nécessaire.

Les Grenouilles venant de Bulgarie sont stockées pendant au moins un mois dans un bac (fig. 1) que nous avons construit, avant leur mise en élevage dans une mare. Ce bac comprend une zone immergée dont l'eau est constamment renouvelée, et une zone émergée maintenue en partie humide, constituée d'une plaque de mousse de polyether reposant sur une grille en métal déployé. L'air peut ainsi circuler en dessous. Ceci évite la pullulation des bactéries dans la mousse qui est une des principales causes de mortalité des Grenouilles. Des abris sont disposés afin de permettre aux Grenouilles de se cacher pendant le jour. L'eau circule de façon continue.

Les Grenouilles séjournent dans la mare pendant un minimum de six mois avant leur utilisation. Afin d'éviter toute fuite des animaux, ces mares, propriétés privées, sont entourées d'un grillage plastique (fig. 2), d'une hauteur de 75 centimètres, prolongé par un surplomb vers l'intérieur de 25 centimètres environ. Ces mares se trouvent près de Rouen (dureté calcique de l'eau 262,5 ppm) ou dans le Domfrontais (dureté calcique de l'eau 15 ppm).

Des animaux en observation sont isolés dans ces mares. Ils sont enfermés dans des cages en plastique (40 cm de hauteur, 56 et 30 cm pour les autres dimensions) dont la maille est trop petite pour livrer passage aux Couleuvres (fig. 3), mais laisse passer les Insectes et autres Invertébrés. Ces cages ne peuvent être immergées que dans leur premier tiers inférieur, le reste étant hors de l'eau.

Au laboratoire, les animaux provenant de l'élevage de l'une des mares sont placés dans des bocaux individuels de 2 litres contenant une plaque de mousse de polyether arrosée tous les 3 jours. Les bocaux sont recouverts d'une toile métallique. Ils sont à une température, soit de 8 à 10°C, soit de 16 à 18°C, soit de 4°C suivant les nécessités

Figure 1.

Bac d'élevage au laboratoire.

Figure 2.

Une mare.

de l'expérience. Les Grenouilles sont soumises à l'alternance régulière du jour et de la nuit. Leur nourriture, distribuée tous les 8 jours, se compose de viande hachée, de vers de farine, de BioMin 66 (Tetra), de fragments de gros vers de terre, de *Tubifex* lyophylisés.

Nous procédons au gavage 24 heures avant le renouvellement de l'eau : la prise de nourriture est toujours suivie du rejet d'excréments qui polluent l'eau.

Avant d'être placés dans les mares et avant expérimentation, tous les animaux sont pesés afin de vérifier qu'ils se sont normalement alimentés : pour éviter tout traumatisme, ils sont placés dans un bas de nylon accroché à un dynamomètre.

B) TECHNIQUES EXPERIMENTALES

1) Injections

a) Injection de solutions

Elles sont effectuées toutes à la même heure dans le sac lymphatique dorsal situé entre la peau et les muscles et limité par des septa. Pour effectuer l'injection, nous piquons dans la peau de la cuisse sans toucher aux muscles sous-jacents. Nous faisons remonter l'aiguille de 30/7 en traversant les septa jusqu'au sac lymphatique dorsal dans lequel sont injectées les solutions. Ce procédé évite que le liquide ne s'écoule, en partie, par le trou percé dans la peau.

b) Injection d'hypophyses

Les hypophyses qui vont être utilisées en vue de provoquer la ponte, sont prélevées stérilement sur des spécimens femelles sexuellement matures, en état d'hibernation. Débarrassées du tissu endolymphatique qui les entoure, elles sont déposées entières dans de l'eau stérilisée et apyrogène contenue dans un godet semi-cristal pour micrographie, stérile, recouvert d'une plaque de verre.

Après différents essais, nous avons remarqué que les hypophyses des femelles sont deux fois plus actives que celles des mâles. D'autre part, le nombre d'hypophyses nécessaires pour obtenir la ponte est d'autant plus grand que le moment de l'injection est éloigné de l'époque

Figure 3.

Cage d'élevage en plastique

normale de la ponte : il est de 5 pour les mois de novembre à janvier, de 3 à 4 pour février mars.

Le nombre d'hypophyses nécessaires est aspiré dans le corps d'une seringue stérile de 2 ml sans aiguille ainsi que 1,5 ml d'eau stérilisée et apyrogène. Puis une aiguille stérile de 30/7 est montée sur la seringue. L'injection se fait par voie intrapéritonéale au niveau du muscle abdominal oblique externe gauche en évitant les organes vitaux et en ménageant les veines abdominale et sous-cutanée.

L'animal, maintenu les pattes postérieures étendues, est manipulé avec douceur afin d'éviter d'abimer les ovules. L'emplacement de la piqûre ayant été nettoyé, l'aiguille est enfoncée verticalement. Les hypophyses plus lourdes que l'eau, sont brisées en fines particules lors de leur passage dans l'aiguille, ce qui facilite l'absorption de l'hormone à travers la membrane péritonéale. L'action des hormones hypophysaires se manifeste extérieurement par de puissantes contractions des muscles abdominaux.

2) Anesthésie

Les Grenouilles sont anesthésiées à l'éther. Puis elles sont lavées dans un courant d'eau distillée pour éliminer l'excès d'éther. Pour des interventions de longue durée, nous utilisons le MS 222 SANDOZ (Tricaïne Méthane Sulfate) en injections dans les sacs lymphatiques dorsaux, chaque injection représentant 1 ml de solution à 1 % dans du liquide physiologique pour Grenouille (NaCl 6,5 g, KCl 0,14 g, $CaCl_2$ crist. 0,20 g, $NaHCO_3$ 0,20 g, eau distillée 1 000 ml).

3) Opérations

Thyroïdectomie

Rana esculenta possède 2 thyroïdes, une droite et une gauche. L'animal, de poids connu, anesthésié à l'éther ou au MS 222 est fixé sur le dos par quatre bandes maintenant les pattes, la tête étant dirigée vers l'observateur. Nous utilisons des instruments stérilisés.

Les Grenouilles sont placées sur une compresse de gaze humide afin d'éviter le dessèchement de la peau.

La peau de la face ventrale de la tête est incisée suivant une ligne joignant les extrémités postérieures de l'os angulaire, en ayant soin de ménager les sacs lymphatiques et les vaisseaux cutanés. L'épisternum apparaît sous la forme d'une spatule cartilagineuse blanchâtre. Il est dégagé complètement et soulevé avec une pince de Kocher qui le maintient rabattu vers le bas, la tête étant maintenue par un élastique passant dans la bouche. Les phases suivantes du prélèvement sont effectuées sous la loupe binoculaire (fig. 4).

Le muscle géniohyoïdien droit est séparé du sternohyoïdien sur la face interne de ce dernier et de l'hyoglosse, ce qui peut être fait sans qu'aucune hémorragie ne se produise. S'il en était autrement, la recherche de la glande deviendrait difficile et la survie de l'animal serait très compromise.

Les muscles géniohyoïdien, sternohyoïdien et hyoglosse sont recouverts à leur partie supérieure par le sous-maxillaire et le subhyoïdien. Les muscles géniohyoïdien et sternohyoïdien sont maintenus éloignés de l'hyoglosse à l'aide d'une sonde de dentiste dont l'extrémité a été recourbée en crochet. Nous écartons alors l'hyoglosse avec une tige métallique recourbée à son extrémité et ne présentant aucune aspérité.

La glande thyroïde apparaît alors. C'est une glande ovale, turgescente, allongée, peu distincte du tissu environnant, qui laisse reconnaître à la loupe binoculaire un assemblage de petites vésicules

et présente un aspect en grappe. Elle mesure de 1 à 2,5 mm. Elle est étroitement collée sur la corne postérieure de l'os hyoïde.

A l'aide d'un sclérotome de Nicati et de ciseaux de Dowel, elle est détachée du processus thyroïde et saisie avec une pince à iris de Graefe. Elle est recouverte d'une enveloppe retenue à l'os hyoïde et qu'il faut décoller soigneusement.

La même technique est employée pour le prélèvement de la thyroïde gauche.

Pour terminer, les bords de l'incision de la peau sont suturés avec une aiguille à pointe triangulaire demi-cercle de 18 mm et un fil de nylon tressé non capillaire n° 000 (Laboratoires BRUNEAU). Nous n'avons jamais remarqué d'infection de la plaie. Au bout de 15 jours, cette dernière est cicatrisée et le nylon se trouve éliminé dans un délai de 30 à 45 jours.

L'absence de restes de glande thyroïde est ensuite vérifiée sur des séries de coupes histologiques d'une épaisseur de 7 µ.

Hypophysectomie

Sous la loupe binoculaire, la muqueuse est incisée au-dessus du parasphénoïde qui est ensuite entaillé à l'aide d'un trépan tubulaire Komet de dentiste n° 8, d'un diamètre interne légèrement supérieur à celui de l'hypophyse, jusqu'à l'obtention d'une fine lame cartilagineuse. Cette lame est délicatement découpée grâce à un sclérotome de Nicati, afin d'obtenir un volet osseux se refermant après l'opération. L'hypophyse antérieure est prélevée à l'aide d'une pince fine et aussitôt

Figure 4.

Glande thyroïde en place

(dissection par la face ventrale)

a : muscle sous-mentonnier.

b : muscle géniohyoïdien.

c : corps propéricarde.

d : muscle subhyoïdien. Il a été incisé.

e : muscle sternohyoïdien. Le droit a été écarté. En dessous, sur son bord externe, se trouve le muscle omohyoïdien.

f : coeur.

g : muscle sous-maxillaire. Il a été découpé.

h : muscle pétrohyoïdien antérieur.

i : "ventraler Kiemenrest" (sous le muscle sternohyoïdien).

j : muscle hyoglosse. Le droit a été écarté légèrement afin de mettre la glande thyroïde en évidence.

k : glande thyroïde.

m : péricarde ouvert.

placée dans un godet demi-cristal pour micrographie, rempli de liquide physiologique et recouvert d'une plaque de verre. Le volet osseux est alors rabattu et la muqueuse du plafond buccal recousue afin de faciliter la cicatrisation. L'ablation de la glande a été ensuite vérifiée sur des coupes histologiques.

Parathyroïdectomie

La première phase de cette intervention est la même que lors de la thyroïdectomie : elle consiste à mettre à nu l'épisternum. Puis sous la loupe binoculaire, le muscle sternohyoïdien est séparé du muscle omohyoïdien. La veine jugulaire externe et le nerf hypoglosse apparaissent (fig. 5). Le muscle omohyoïdien est maintenu écarté à l'aide d'une sonde de dentiste dont l'extrémité a été recourbée en crochet. Les "ventraler Kiemenrest" ovoïdes très vascularisés peuvent alors être observés. Ils servent de point de référence pour la localisation des parathyroïdes. Ce sont deux paires de petits corps (0,5 à 1 mm de diamètre) se trouvant le long de la veine jugulaire externe près du bord postérieur des "ventraler Kiemenrest". Les parathyroïdes peuvent être prélevées intactes en les détachant du tissu conjonctif qui les entoure à l'aide d'une pince à iris de Graefe. La même technique est utilisée pour la parathyroïdectomie du côté opposé. Pour terminer, les bords de l'incision de la peau sont suturés.

Nous n'avons jamais observé d'infection.

Des animaux ont été opérés à blanc. Ils ont subi le même traitement, mais le prélèvement final des parathyroïdes n'a pas été effectué.

Castration

Sur des Grenouilles anesthésiées à l'éther, une ouverture de quelques millimètres est pratiquée dans les plans cutané et musculaire de l'abdomen. Les deux ovaires sont alors saisis avec des pinces et coupés près des corps adipolymphoïdes. Une suture est effectuée en deux plans à l'aide d'une aiguille de Reverdin très fine et d'un fil de nylon tressé non capillaire n° 000. Au bout de 15 jours la plaie est cicatrisée.

4) Histologie

Thyroïde

Après prélèvement, le matériel est fixé au Bouin-Hollande pendant 2 jours ou au Helly pendant 5 heures.

Les colorations sont exécutées selon trois méthodes qui donnent des résultats comparables.

- Azan à chaud (technique de Heidenhain)

Cette technique allie les avantages du bleu d'aniline en tant que colorant des fibres du collagène, avec une coloration nucléaire d'une précision qui égale celle des laques régressives d'hématoxyline et des réactions nucléales. En outre, peu de méthodes assurent une coloration aussi différenciative des grains de secrétion. Nous effectuons cette technique de la façon suivante :

Coupes non collodionnées.

- Coloration dans l'azocarmin G pendant une heure à l'étuve à 56°.
- Refroidissement, puis lavage à l'eau distillée.

Figure 5

Parathyroïdes droites

l'extrémité de la tête étant tournée vers l'observateur

J : veine jugulaire externe.

C : veine sous-clavière.

O : muscle omohyoïdien. Il a été écarté.

S : muscle sternohyoïdien.

N : nerf hypoglosse.

K : "ventraler Kiemenrest".

- Différenciation sous le contrôle du microscope par l'alcool aniline (1).
- Arrêt de la différenciation par un passage rapide de 30 secondes dans l'alcool acétique à 1 %.
- Lavage à l'eau distillée.
- Mordançage pendant 5 minutes dans l'acide phosphotungstique.
- Lavage à l'eau distillée.
- Coloration pendant 1 heure par la solution diluée de bleu de Heidenhain.
- Déshydratation et montage au baume.

- Azan à froid (variante de Schleicher)

- Coloration dans l'azocarmin B pendant 20 minutes.
- Lavage à l'eau distillée.
- Différenciation du carmin par l'acide phosphotungstique, sous contrôle du microscope, suivant la méthode indiquée ci-dessus, jusqu'à l'obtention d'un conjonctif presqu'incolore.
- Lavage à l'eau distillée.
- Coloration par le bleu d'aniline-orange G dilué pendant 20 minutes.
- Déshydratation et montage au baume.

---

(1) Afin d'éviter de mouiller la platine du microscope, nous utilisons le précilame de Locquin comme support de lame. La mise au point est effectuée une fois pour toutes, ce qui permet le contrôle rapide d'une série de lames.

- Nous avons voulu utiliser également une méthode de coloration trichrome classique. Ces colorations donnent d'excellents résultats, mais demandent une différenciation de longue durée et un contrôle de chaque lame au microscope. C'est un inconvénient lorsque les besoins imposent un travail en série ou l'obtention de résultats au bout d'un temps assez court. La méthode que nous décrivons ici ne nécessite qu'une différenciation rapide, sans contrôle du microscope ; en effet, un léger dépassement du temps de différenciation ne nuit en rien à la qualité de la coloration. Elle donne les mêmes résultats que la méthode classique d'A. Prenant. Elle est d'ailleurs inspirée de la variante de la triple coloration de Prenant, décrite par Gabe, pour la coloration de l'appareil digestif des Onychophores. La technique de Gabe s'est révélée défectueuse pour la coloration de la glande thyroïde : la substance colloïde est colorée en rose comme le cytoplasme, ce qui empêche l'observation des granules colloïdes dans les cellules. Aussi avons-nous utilisé cette technique modifiée de la façon suivante :

1° Fixer au Bouin-Hollande pendant deux jours ou au Helly pendant 5 heures.

2° Déparaffiner les coupes, mais non les collodionner.

3° Colorer par la trioxyhématéine ferrique sur lame pendant 2 minutes.

4° Laver sous un courant d'eau distillée pendant 30 secondes.

5° Colorer pendant 10 minutes dans le mélange obtenu en dissolvant dans l'ordre à la température du laboratoire :

Eau distillée..... 100 ml

Erythrosine jaunâtre.....	1 g
Vert lumière.....	0,2 g
Acide phosphomolybdique.....	0,5 g
Acide acétique.....	0,5 ml

Ce colorant se conserve très bien à la lumière à la température du laboratoire. La quantité d'acide acétique doit être mesurée avec soin, car un excès, même léger, peut nuire considérablement à la coloration. Cette dernière peut se faire sur lame ou en tube Borrel. On peut observer qu'un dépassement, même considérable, du temps de séjour dans le colorant ne présente aucun inconvénient : le vert lumière agit comme différenciateur de l'érythrosine.

6° Laver rapidement à l'aide d'eau acétifiée à 0,5 %. L'emploi d'environ 30 ml de cette eau donne des résultats constants et bons. 10 ml doivent être jetés sur la face de la plaque portant les coupes ; puis, 10 ml sont répandus sur l'autre face ; les derniers 10 ml sont jetés à nouveau sur la face portant les coupes. L'acide acétique agit comme différenciateur du vert lumière.

7° Laver promptement à l'eau distillée pour éliminer l'eau acétifiée et arrêter la différenciation du vert lumière.

8° Passer de l'alcool absolu sur la lame. Ce dernier agit comme déshydratant, mais aussi comme différenciateur de l'érythrosine jaunâtre. La meilleure différenciation est obtenue lorsqu'on voit encore à la base de la lame quelques gouttes d'alcool légèrement colorées en rose.

9° Verser du toluène suivant la longueur de la lame, de manière à chasser l'alcool qui imprègne les coupes.

10° Repasser rapidement à l'alcool absolu afin d'éliminer les dernières traces d'eau pouvant séjourner sur la lame. Mais la différenciation de l'érythrosine n'est pas modifiée puisque le toluène arrête cette différenciation.

11° Verser à nouveau et promptement du toluène.

12° Monter au baume.

RESULTATS :

Noyaux : noirs.

Hématies : rouges.

Fibres collagènes : vert clair.

Colloïde : vert foncé.

Cytoplasme : rose foncé.

Tissu musculaire : rouge.

Hypophyse

L'animal étant décapité, l'encéphale et l'hypophyse attenante sont disséqués aussi vite que possible et plongés dans le fixateur. Nous avons utilisé le Bouin-Hollande ou le Bouin-Hollande sublimé pendant 6 à 12 heures.

Les colorations sont exécutées suivant la méthode trichromique de Cleveland-Wolfe ou celle de Herlant (1960), basée sur l'emploi simultané du P.A.S. et du bleu alcian en solution à pH3 ou à pH 0,2.

Les cellules δ sont comptées chez chaque animal sur dix coupes voisines du plan de symétrie de l'encéphale et distantes les unes des autres de 15 µ.

Parathyroïde

Des Grenouilles sont prélevées au cours de l'année dans les mares. Elles sont immédiatement tuées. La région correspondant aux parathyroïdes est fixée au Bouin-Hollande. La coloration est effectuée à l'Azan à chaud.

5) Mesure du volume érythrocytaire

Pour éviter toute contamination, le sang est prélevé directement dans le ventricule. Sur une Grenouille anesthésiée à l'éther, le coeur est mis à nu, le péricarde enlevé. En maintenant délicatement le ventricule à l'aide d'une pince souple, le myocarde est percé avec la pointe d'une aiguille à injections héparinée dont le cône a été coupé. A l'extrémité de cette aiguille, un microtube capillaire hépariné est adapté. A chaque systole, le sang du ventricule monte à l'intérieur du microtube.

Les microtubes ont une longueur de 75 mm et un diamètre interne de 1 mm. Ils sont remplis aux deux tiers. Seuls les 5 premiers microtubes sont utilisés. Ils donnent tous les cinq les mêmes concentrations ; l'expérience a montré que les valeurs hématocrites baissent ensuite rapidement. La lymphe remplace le sang et compense la perte de volume. Le retour rapide de la lymphe dans le système sanguin serait facilité par les coeurs lymphatiques (Conklin, 1930), qui sont au nombre de deux paires, une paire antérieure s'ouvrant dans la veine abdominale, et une paire postérieure s'ouvrant dans la veine ischiatique. Ces coeurs portent des valvules. La lymphe, provenant des sacs lymphatiques, après avoir traversé les capillaires, arrive aux coeurs lymphatiques par les troncs lymphatiques.

Tous les échantillons ont été centrifugés immédiatement après le prélèvement. La vitesse de rotation de la centrifugeuse microhématocrite est de 12 300 tours/mn, avec une accélération centrifuge relative de 14 400 g. La centrifugation dure 5 minutes.

6) Biochimie

a) Dosage du calcium

Prélèvement du plasma

Le sang est prélevé de la même façon que lors de la mesure du volume érythrocytaire. La partie du microtube contenant le plasma est coupée avec une lime et versée dans un flacon. Nous avons utilisé l'héparinate de lithium. Michod, Plastsoukas et Frei (1969) ont montré que cet anticoagulant n'influence pas le dosage des électrolytes, notamment celui du calcium au moyen du photomètre de flamme. L'addition d'anticoagulant diminue les risques d'hémolyse. Le plasma hémolytique est rejeté. Lorsqu'un plasma repose longtemps, il se forme des couches de composition variable, avec peu de calcium en haut. Il est très difficile de l'homogénéiser ensuite en agitant le récipient. Ce phénomène peut provoquer des erreurs étant donné que les prélèvements sont faits avec une pipette. Aussi, afin d'éviter ces processus de dissociation qui pourraient gêner le dosage du calcium, on a toujours procédé aux mesures immédiatement après centrifugation. Après la mort de l'animal, un examen macroscopique des viscères est toujours pratiqué.

Dosage

Les mesures sont effectuées au photomètre de flamme PF 5 de Carl Zeiss. Lors de l'analyse du plasma par la photométrie de flamme,

il peut intervenir une série d'erreurs dont les causes tiennent plus au procédé employé qu'à l'instrument lui-même. Il faut mentionner les perturbations d'ordre passif qui se traduisent par une accentuation du fond de flamme ainsi que les influences d'émission provenant d'éléments secondaires des solutions et susceptibles d'augmenter ou de réduire le rayonnement propre à l'élément à analyser. Pour éliminer ces deux catégories de perturbations, nous avons employé des solutions passives pour le réglage du zéro. Ces solutions sont adaptées à la dilution du plasma, mais ne contiennent pas l'élément à doser lui-même, en l'occurrence, le calcium. Pour le réglage de la sensibilité de l'instrument, nous employons une solution d'étalonnage qui contient des concentrations connues en sodium, potassium et calcium. Les autres éléments qui composent le plasma tels que protéïnes, sucre et phosphate ne sont pas pris en considération. Grâce à la conception particulière de l'instrument, les perturbations dues à ces substances sont toutefois réduites jusqu'à être négligeables, du fait que la fraction de liquide à analyser qui parvient jusque dans la flamme est répartie en gouttelettes particulièrement fines. Cette fraction est donc vaporisée rapidement et d'une manière sensiblement complète, indépendamment de la composition chimique et des éléments secondaires qu'elle contient. Une réduction de l'émission du calcium par le phosphate est, en outre, évitée du fait que le pyrophosphate de calcium qui se forme et qui est difficilement vaporisable, peut encore être amené intégralement à participer à l'émission.

Pour la préparation des solutions étalons et des solutions aqueuses de plasma, nous avons obtenu un très fin brouillard uniforme par addition d'un agent d'humidification le Sterox SE (Harleco) qui

réduit la tension superficielle et, par suite, les risques d'obstruction du pulvérisateur. L'agent d'humidification réduit, en même temps, la grosseur des gouttelettes de brouillard dans la flamme. Outre l'agent d'humidification, l'addition d'acide chlorhydrique permet de réaliser une homogénéisation très poussée du plasma dans la solution aqueuse de dilution.

	Teneur en éléments - g/litre				Ag.d'humid.
	Na Cl	Kcl	$CaCO_3$	HCl	
Solution étalon.....	8,39	0,286	0,250		
Solution passive....	8,39	0,286	0		
Solution de dilution	0	0	0	0,1 N	0,02 %

L'eau utilisée pour les rinçages et pour les solutions provient d'un échangeur d'ions. Toutes les solutions, de même que l'eau employée, sont conservées dans des flacons en polyéthylène car les flacons de verre peuvent transmettre des ions aux liquides. Toute la verrerie est scrupuleusement nettoyée à l'Extran (Merck), rincée à l'eau courante provenant d'un échangeur d'ions et protégée de la poussière jusqu'à son emploi. Pour la détermination du calcium, nous employons l'acétylène épuré et l'air comprimé (air synthétique) fournis par des bouteilles métalliques.

Les mesures sont répétées sur le même échantillon aussi fréquemment que la quantité d'échantillon le permet. Nous avons, ensuite, calculé la moyenne des résultats fournis par les mesures individuelles. Dans chaque série de dosages, chaque jour, nous avons inclus un sérum de contrôle de nature physico-chimique identique à celle du prélèvement à analyser et soumis tout au long du mode opératoire aux mêmes causes d'erreurs que l'échantillon à analyser. Nous utilisons le "Labtrol" ou le "Patho-trol" (Dade Reagents). Les valeurs obtenues sont comparées à celle notée sur la fiche des constituants du sérum de contrôle. Le dosage est considéré exact lorsqu'il est compris dans les limites de variations admissibles indiquées. Nous vérifions, alors, qu'il est précis en calculant les paramètres du laboratoire. Les valeurs quotidiennes obtenues pour le sérum de contrôle doivent se répartir également de part et d'autre de la moyenne.

b) Dosage du phosphore inorganique

Prélèvement du plasma

Il est effectué de la même façon que lors du dosage du calcium.

Dosage

Nous avons utilisé la technique décrite par Kurzweg et Massmann (1962). Le phosphore mis en présence de molybdate d'ammonium et de p - sémidine (N - phényl - p - phénylène diamine) comme réducteur donne un complexe phosphomolybdeux molybdique d'une coloration bleue très intense permettant le dosage, à 740 mμ.

Comme pour le calcium, un sérum de contrôle (Labtrol ou Patho-trol) a été employé.

C H A P I T R E II

-=-=-=-=-=-

ACTION DE L'OBSCURITÉ ET DU FROID SUR LA GLANDE THYROÏDE

De nombreuses recherches tant physiologiques qu'histophysiologiques effectuées sur les Mammifères et spécialement sur les animaux de laboratoire (Chien, Rat, Cobaye, Lapin) ont bien montré le rôle de la thyroïde dans la régulation de la température, principalement dans les réactions de leur organisme au froid : l'hormone thyroïdienne élève la production d'énergie et la consommation d'oxygène de la plupart des tissus normaux. Chez les Amphibiens, Wolf (1934), Morgan et Mayer (1936), Morgan et Fals (1942) ont montré que la structure histologique de la thyroïde variait au cours de l'année. Delsol et Verne

(1956) ont mis en évidence une périodicité saisonnière de la sécrétion de l'hormone thyréotrope. La thyroïde, active en hiver, se met presque au repos pendant l'été, mais l'existence d'une action calorigène reste difficile à démontrer.

La lumière est, avec la température, un facteur très important de l'activité des animaux. La thyroïde n'est pas aussi directement en jeu dans les mécanismes physiologiques en relation avec la lumière que dans ceux qui sont conditionnés par la température. Cependant, il est intéressant, en raison de l'importance de la thyroïde dans l'activité générale de l'organisme, d'étudier ses réactions possibles aux variations de ce facteur. Les conditions auxquelles nous avons soumis les animaux correspondent dans la nature au repos hivernal.

Nos recherches sont uniquement d'ordre histophysiologique. Nous rappellerons donc, brièvement pour commencer, les grandes lignes de l'histophysiologie de la thyroïde.

L'unité histologique de la glande est représentée par le follicule ou vésicule colloïde ou acinus de forme plus ou moins arrondie. Il est limité par une couche de cellules sécrétrices et l'intérieur de sa cavité est occupé par de la colloïde, substance visqueuse, transparente *in vivo*, homogène, acidophile, formée de protéïnes iodées et de nucléoprotéïnes non iodées. Les follicules sont séparés les uns des autres par une couche de tissu conjonctif réticulé dans lequel serpente un riche réseau vasculaire et lymphatique. Malgré cette structure très simple, le mécanisme de sécrétion est très complexe et encore mal connu. Les cellules sont en effet, à double polarité sécrétoire : sécrétion par le pôle apical, dirigé vers l'intérieur du follicule, de la colloïde

que l'on doit considérer comme une réserve pré-hormonale et qui est facile à mettre en évidence par coloration sur coupe ; sécrétion par le pôle basal, dans les capillaires sanguins, de l'hormone active, sous forme invisible cette fois. A ces deux phénomènes de sécrétion en sens opposé s'en superpose un troisième : passage à travers la cellule du pôle apical au pôle basal, de la colloïde mise en réserve.

On a décrit de nombreuses variations de structure des follicules et des cellules sécrétrices en cherchant à les rapporter aux trois processus dont nous venons de parler. En raison même de la complexité de ces derniers, tous les auteurs ne sont pas d'accord sur la signification fonctionnelle des différentes images observées au microscope. Il est classique, cependant, de distinguer deux aspects fondamentaux extrêmes : l'un qui correspond à un état de repos, et l'autre, à un état de grande activité de la glande.

Sans entrer dans les détails sur lesquels nous aurons l'occasion de revenir au cours de l'exposé de nos résultats, nous pouvons dire, dès maintenant, que l'état de repos est caractérisé par des follicules distendus, remplis de colloïde homogène, limités par des cellules basses à noyau aplati plus ou moins riche en chromatine, situé vers la base et dont le cytoplasme est dépourvu d'inclusions, excepté quelques grains de colloïde chromophile dans certaines d'entre elles (6 % environ).

L'état d'activité, au contraire, correspond à des follicules plus ou moins plissés, à colloïde très peu abondante, présentant de nombreuses vacuoles, et dont les cellules sont de forme prismatique ou cylindrique, élevées, à noyau situé près de la base ou du sommet et

dont le cytoplasme contient de nombreux grains de colloïde, surtout apicaux.

Nos recherches ont été effectuées de janvier à mai sur des Grenouilles mâles. Les animaux étaient placés dans des bocaux individuels, les témoins étaient conservés au laboratoire, à une température de 8 à 10°C et soumis à l'alternance régulière du jour et de la nuit.

Pour apprécier l'état fonctionnel de la thyroïde, nous avons utilisé comme seul critère l'aspect des vésicules et surtout des cellules. Ce critère est très sensible. Starr et Rawson (1937) ont montré, en effet, que des doses infimes d'hormone thyréotrope étaient susceptibles de faire varier la hauteur cellulaire et l'abondance des enclaves cytoplasmiques et, plus particulièrement, des grains de colloïde. Nous n'avons pas tenu compte de la dimension des vacuoles intra ou extracellulaires, car elle est susceptible de varier avec la nature et, peut-être, avec la durée d'action du fixateur. D'autre part, les vésicules périphériques et les vésicules centrales ont un épithélium qui ne réagit pas avec la même vitesse. En prenant la précaution d'étudier séparément l'épithélium des deux catégories de vésicules, on obtient des résultats qui peuvent caractériser l'état fonctionnel général de la glande.

A) ANIMAUX TEMOINS

La thyroïde des témoins (fig. 6) est à l'état de repos. Elle possède des follicules entourés d'une couche conjonctive réticulée, lâche, avec un riche réseau vasculaire. Ils sont d'une taille presque égale : 0,3 mm ; leur forme est régulière ; très peu sont

découpés ou diverticulaires. Les cellules de l'épithélium sont basses ; elles ont, en moyenne, 8 µ de haut. Le noyau est sphérique, avec un diamètre moyen de 6 µ. On observe une accumulation de colloïde chromophile. Cette dernière ne contient pas de vacuoles de résorption. Il existe peu de différenciations cytoplasmiques ; seuls, quelques grains de colloïde se rencontrent dans les cellules. La rétraction de la colloïde qu'on peut constater est due à l'action du fixateur : elle est bien marquée avec le Bouin-Hollande, elle l'est beaucoup moins avec le Helly.

B) ACTION DE L'OBSCURITE SEULE

1) Protocole expérimental

Les bocaux qui contiennent les Grenouilles sont enfermés dans des caisses de carton entièrement tapissées de papier noir et disposées près des bocaux contenant les animaux témoins ; elles sont donc soumises à une température de 8 à 10°C. Elles sont réparties en lots de 6 qui sont sacrifiés au bout de 5, 8, 14 et 21 jours. Les mesures sont effectuées sur des séries de 300 cellules.

2) Résultats

- 5e jour

La hauteur moyenne des cellules (11 µ) est égale à une fois et demie le diamètre (7 µ) du noyau sphérique, à chromatine finement granuleuse. Elles sont larges dans les follicules périphériques, plus étroites dans ceux du centre. On retrouve ici le décalage entre les follicules périphériques et les follicules centraux indiqué au

Fig. 6 - Animaux témoins.

Fig. 7 - Thyroïde de Grenouille placée à l'obscurité pendant 5 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : Azan à chaud.

Fig. 8 - Thyroïde de Grenouille après 5 jours d'obscurité. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : Azan à froid.

Fig. 9 - Thyroïde de Grenouille placée à l'obscurité pendant 8 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

début. On observe de nombreuses vacuoles à l'intérieur de la colloïde. Un grand nombre d'entre elles, situées à la périphérie, peuvent s'expliquer par la rétraction des pseudopodes des cellules par suite de l'action du liquide fixateur. Les grains de colloïde dans les cellules peuvent atteindre 4 µ. Il en existe 3 ou 4 dans toutes les cellules. Ils se trouvent le plus souvent à leur sommet, mais on en rencontre parfois à leur base.

On voit également des paquets de cellules : ce sont des microfollicules coupés tangentiellement (fig. 8). Les vésicules sont plissées, de nombreuses amitoses s'étant produites (fig. 7). On retrouve la trace de ces amitoses sous forme de cellules binucléées.

On a donc un début d'activation.

- *8e jour*

Les cellules deviennent plus larges et légèrement plus basses (9 µ). Les grains de colloïde chromophile subissent une cytolyse poussée et ils sont maintenant très peu nombreux. Les follicules se déplissent. Ils sont alors de plus grande taille : dimension moyenne de 0,35 mm. Les vacuoles d'Aron ne se rencontrent plus que dans le colloïde de quelques acini (fig. 9), plus particulièrement de ceux qui, se trouvant à la périphérie, présentent ce phénomène constant d'un retard dans leurs réactions.

Il y a ainsi diminution de l'activité thyroïdienne.

- *14e jour*

L'épithélium des follicules redevient un peu plus haut (11 µ). Les grains de colloïde chromophile apparaissent à nouveau. Ils forment d'énormes gouttelettes de 4 µ de diamètre (fig. 17 : d).

La "vacuolisation" de la colloïde devient plus importante : 80 p. 100 des follicules possèdent une colloïde vacuolisée, alors qu'auparavant il n'en existait que 15 p. 100. Quelques pseudopodes pénètrent dans la colloïde. On a un nouveau cycle de sécrétion. Mais les cellules restent larges et il ne se produit pas d'amitose.

On a donc une réactivation de la glande qui est, d'ailleurs, provisoire.

- 21e jour

Les grains de colloïde ont totalement disparu. Il y a accoutumance ; une néosécrétion de colloïde visqueuse a rempli les follicules. Chez certains sujets, on trouve un tissu interstitiel qui présente une hyperplasie résiduelle. On remarque une hypertrophie réelle des cellules (15 µ). Les grandes vésicules ont poussé de nouveaux bourgeons qui se sont remplis de colloïde. Il y a à la fois hyperplasie du parenchyme thyroïdien et du tissu interstitiel parafolliculaire (fig. 10).

3) Discussion

Bien que l'action de l'obscurité sur la thyroïde ait fait l'objet d'un assez grand nombre de travaux, l'opinion des auteurs reste divisée. Dern (1953) montre que les thyroïdes des animaux exposés à la lumière pendant de courtes périodes sont plus actives que celles des animaux exposés de façon permanente à la lumière.

G. Puntriano et J. Meites (1951) ont observé, chez la souris, qu'un obscurcissement de 28 jours augmente la fixation de I^{131} dans la thyroïde.

A. Psychoyos (1957) trouve que l'obscurité continue pendant 6 jours chez le Rat, diminue un peu la fonction thyroïdienne et qu'une obscurité de 25 jours l'augmente.

G. Cehovic (1957) montre que l'obscurcissement pendant 5 ou 7 jours diminue considérablement, chez la Grenouille, l'activité thyroïdienne.

Mais Florentin (1937) trouve des résultats contraires chez le Crapaud.

Ces contradictions peuvent peut-être s'expliquer par des différences entre les espèces utilisées et aussi par les variations de la durée des expériences, l'examen des glandes ayant été effectué au bout d'un temps variable, généralement unique. Nous avons vu, en effet, que l'aspect histologique de la glande varie en fonction de la durée du séjour à l'obscurité.

Blanquet *et al* (1968), analysant les travaux de Cehovic et de Toutain pensent que les discordances observées chez les Amphibiens à la suite de variations dans l'illumination peuvent être rapportées à la périodicité saisonnière de ces animaux.

En résumé, le maintien à l'obscurité détermine, chez la Grenouille verte, un cycle dans la sécrétion de la thyroïde. Il y a d'abord une légère activation ; mais au bout de 8 jours, la sécrétion se ralentit. On trouve une nouvelle activation peu importante le 14e jour. Après 3 semaines, apparaissent des changements régressifs ; les vésicules deviennent beaucoup plus larges.

Fig. 10 - Thyroïde de Grenouille placée à l'obscurité pendant 21 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érytrosine, vert lumière.

Fig. 11 - Thyroïde de Grenouille ayant subi une température de - 3°C pendant 3 jours (Expérience sans accoutumance). Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

Fig. 12 & 13 - Thyroïde de Grenouille demeurée à une température de - 3°C pendant 6 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

C) ACTION DU FROID

1) Protocole expérimental

Il ne nous a pas été possible, faute de moyens techniques appropriés à l'époque où ces expériences ont été réalisées, de séparer l'action du froid de celle de l'obscurité ; les animaux devant subir l'action du froid ont dû être placés dans des réfrigérateurs complètement fermés et ont donc séjourné constamment à l'obscurité ; mais les animaux de la série précédente (obscurité) constituent des témoins pour séparer l'action du froid et celle de l'obscurité.

Les animaux de la sous-espèce *hungarica* sont plus résistants au froid et supportent moins la chaleur que les animaux de la variété du type normal. Nous avons pu garder les premiers pendant 50 jours à la température de - 3°C, sous la réserve, toutefois, d'une période d'acclimatation de 3 jours. Leur température interne était alors de - 1°C. Malgré cette précaution, les Grenouilles de la sous-espèce *esculenta* n'ont pas survécu plus de 4 à 5 jours. Cependant, elles peuvent vivre longtemps à - 1°C qui correspond à une température interne de 0°C.

Toutes les expériences relatives à l'action du froid ont été, pour cette raison, menées uniquement sur des Grenouilles de la variété *hungarica*. Réparties en lots de quatre, elles ont été placées dans un réfrigérateur à - 3°C. Pendant toute la durée de l'expérience, elles n'ont pas reçu de nourriture et on a supprimé l'arrosage de la mousse, ce qui n'offre pas d'inconvénient, les animaux, à cette température, étant très peu actifs et l'atmosphère du réfrigérateur étant saturée d'humidité. Afin d'éviter une action trop brusque, les animaux

d'expérience ont été soumis progressivement pendant 3 jours à des températures allant de + 10°C à - 3°C. Nous avons cependant placé directement un lot de 4 animaux à - 3°C et l'y avons laissé pendant 3 jours seulement, les animaux mourant dans ces conditions au bout de 5 à 6 jours.

Les Grenouilles de cette série d'expériences ont été sacrifiées au bout de 3, 6, 15 et 25 jours.

2) Résultats

3e jour. EXPERIENCE SANS ACCOUTUMANCE - Il y a décharge de colloïde transcellulaire (fig. 11). Les cellules émettent des pseudopodes, réaction qui a été interprétée par Ponse (1951) comme une véritable phagocytose de la colloïde (fig. 22 : a).

Des gouttelettes colloïdes chromophiles existent dans les cellules et notamment dans les pseudopodes (fig. 15). Elles peuvent avoir jusqu'à 2 µ de diamètre.

Les acini périphériques présentent seulement un début d'activation : leurs cellules sont en dôme faisant saillie dans la colloïde et on ne voit que de rares émissions de vacuoles. Ces cellules ont, en moyenne, 12 µ de haut. Les noyaux sphériques ont un diamètre moyen de 7 µ.

Par contre, les follicules centraux manifestent une activité plus importante. Leurs cellules sont hautes (14 µ) et expulsent des bulles liquides (fig 22 : c) : les vacuoles de résorption d'Aron. Les noyaux ont un diamètre de 8 µ.

Fig. 14 - Thyroïde de Grenouilles demeurée à une température de - 3°C pendant 6 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

Fig. 15 - Grains de colloïde dans les cellules. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : Azan à chaud.

Fig. 16 & 17 - Thyroïde de Grenouille soumise à une température de - 3°C pendant 15 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

La turgescence cellulaire s'accompagne de l'apparition d'amitoses qui divisent les cellules dans un plan parallèle à la surface (fig. 23). Des paquets de cellules parafolliculaires se forment ainsi. Ce sont des cellules spéciales dérivant de la surface épithéliale (Thomas, 1944) et devenant sous-jacentes à l'épithélium normal (Ponse, 1938 , Aleschin, 1939). Ensuite, les cellules du follicule se compriment latéralement.

Il y a donc une activation intense.

EXPERIENCE APRES ACCOUTUMANCE - La plupart des noyaux sont toujours sphériques. Des vacuoles apparaissent sur le bord de la colloïde. Les cellules ont 12 µ de haut et possèdent parfois des noyaux elliptiques. Dans les cellules, les grains de colloïde sont peu nombreux. La colloïde est encore très dense à la fin de la période d'accoutumance.

On a seulement un début d'activation.

6e jour.

Les granules colloïdes deviennent plus gros. On en trouve dans de nombreuses cellules. Celles-ci s'élargissent, elles sont hautes (15 µ) (fig. 12).

Dans 7 p. 100 des follicules, des diverticules se forment à partir de leur épithélium. Un diverticule produit par la paroi de la cavité de l'acinus se dirige vers le côté opposé de cette cavité. Il le rejoint bientôt et il y a division en deux du follicule. En général, cette division est inégale et on obtient un grand follicule flanqué d'un petit (fig. 13 & 14).

Fig. 18 - Thyroïde de Grenouille ayant subi une température de - 3°C pendant 15 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : Azan à froid.

Fig. 19 - Thyroïde de Grenouille soumise à une température de - 3°C pendant 15 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

Fig. 20 - Thyroïde de Grenouille demeurée à une température de - 3°C pendant 15 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : Azan à chaud.

Fig. 21 : Thyroïde de Grenouille ayant subi une température de - 3°C pendant 25 jours. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : Azan à froid.

Fig. 22 - a) Formation de pseudopodes par les cellules. Fixation : Helly. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

b) Emission de bulles spumeuses dans la colloïde. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

c) "Vacuoles de résorption" d'Aron. Fixation : Helly. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

d) Grains colloïdes dans les cellules et dans les pseudopodes. Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

Fig. 23 - Thyroïde de Grenouille demeurée à une température de - 3°C pendant 3 jours. (Expérience sans accoutumance). Fixation : Bouin-Hollande. Coloration : trioxyhématéine, érythrosine, vert lumière.

L'activation de la glande continue.

15e jour.

Sur les coupes, on retrouve les grands follicules avec les petites vésicules qu'ils ont données et qui leur sont accolées (fig. 16). Leur division s'est arrêtée. Tandis que certains follicules sont en repos, d'autres exagèrent leur sécrétion (fig. 17 & 18). Les cellules interstitielles forment des microfollicules ; on trouve donc de grands follicules entourés de nombreux microfollicules. Le cycle de sécrétion de colloïde se poursuit. Les vacuoles d'Aron contenues dans la colloïde sont beaucoup plus nombreuses et plus importantes (fig. 19). Il apparaît quelques "bulles spumeuses" (Ponse, 1951) (fig. 22 : b).

On trouve encore quelques grains de colloïde. Les cellules épithéliales des follicules de la périphérie possèdent des pseudopodes importants entrant dans la colloïde qui n'a pas pu se rétracter par suite de la pénétration rapide du fixateur à cet endroit;

On rencontre de nombreux paquets de cellules parafolliculaires. Les cellules des microfollicules sont hautes (13 à 14 µ) (fig. 20). Certains macrofollicules commencent à prendre l'état de repos : la hauteur de leurs cellules diminue (11 µ). Cependant, la taille des noyaux demeure constante (8 µ) ; quelques-uns d'entre eux sont caractérisés par une chromatine en forme d'amas.

L'activation est à son maximum.

25e jour.

L'excrétion s'achève ; quelques follicules ont encore une colloïde très vacuolisée ; la plupart d'entre eux ont repris un

aspect de repos glandulaire complet (fig. 21) ; les noyaux ont 6,5 µ de diamètre ; des cellules quasi-endothéliales, basses (9 µ), bordent la colloïde dense. La néosécrétion de colloïde visqueuse est rapide. Il y a eu cytolyse des grains de colloïde chromophile, un écartement des cellules parafolliculaires interstitielles donnant des microfollicules, ce phénomène étant dû à l'intense activation qui s'est produite au cours des jours précédents.

3) Discussion

Ces résultats confirment ceux de Sellers et You (1950), de Ponse (1951) et de Hoffmann et Zarrow (1958) qui signalent que le froid amène une activation de la thyroïde chez le Rat. Mais le repos, au lieu de se produire le 18e jour, ne s'effectue que le 27e. Cependant, Fontaine et Lachiver (1955) indiquent des cas d'un tel repos entre le 20e et le 45e jour, suivant les individus.

Par contre, nous n'avons pas remarqué, chez les animaux passés par une période d'adaptation, d'augmentation de la rapidité de destruction des réserves contenues dans le follicule, comme l'ont montré Hsieh et Carlson (1958) chez le Rat ; même la phase de repos est apparue plus tardivement.

Il est possible que les animaux que nous avons utilisés aient subi une adaptation incomplète. Cependant, nous avons remarqué une plus grande activation thyroïdienne dans le lot d'animaux placés directement à - 3°C ; ceci pourrait s'expliquer par une plus forte consommation d'hormone thyroïdienne par les tissus périphériques. Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par Knigge, Goodman, Solomon (1957) qui pensent que le froid détermine une brève accélération

suivie d'une inhibition complète de la libération du I^{131} par la thyroïde.

Ces modifications cytologiques de la thyroïde correspondent à une activation au niveau du lobe antehypophysaire (Toutain, 1962), chez des Grenouilles placées dans des conditions analogues. Le froid détermine une accélération des processus de la sécrétion de l'hormone thyréotrope : à la température du laboratoire, l'hypophyse antérieure des témoins montre peu de cellules δ (19 ± 4 cellules δ) et leurs granulations sont fines. Par contre, dès le 3e jour d'un séjour à - 3°C, le nombre de cellules δ a considérablement augmenté. Il est de 55 ± 7 par coupe. Le phénomène va en s'accentuant jusqu'au 15e jour (127 ± 8 cellules δ). Les grosses granulations sont nombreuses dans le cytoplasme. Puis, le nombre de cellules δ diminue. De grosses vacuoles se forment précocement dans 7 à 8 % d'entre elles et le 38e jour on ne dénombre plus que 26 ± 7 cellules δ dépourvues de grosses granulations. Cet aspect cytologique peut être interprété comme une baisse de l'activité thyréotrope. Il coïncide avec une accoutumance et un retour à un stade de repos de la thyroïde. La thyroïdectomie provoque une augmentation du nombre de cellules δ moins importante que celle produite par l'action du froid (en microscopie photonique, Toutain, 1962, en microscopie électronique, Doerr-Schott, 1966). Sous l'influence simultanée de la thyroïdectomie et du froid, (Toutain, 1962) on observe une variation du nombre de cellules δ de beaucoup plus grande amplitude que lorsque le froid agit seul. Les cellules δ qui étaient disséminées paraissent se grouper

en cordons homogènes, notamment dans la partie centrale de la glande, peut-être à la suite de la différenciation d'élémen s chromophobes intermédiaires ; le 8e jour, on compte 169 ± 13 cellules δ sur une coupe. Mais dès le 15e jour, leur nombre diminue (131 ± 10 cellules δ). Le 22e jour, on en compte 116 ± 6 ; le 30e, 58 ± 9. Ce n'est que le 38e jour qu'il apparaît des cellules thyréoprives faiblement colorées. Ces dernières possèdent une seule grosse vacuole qui occupe le tiers du protoplasme. Elles s'hyperplasient et sont dégranulées. Leur noyau, sphérique, est de grande taille. Elles correspondent, peut-être, à une fatigue de l'hypophyse antérieure.

Il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux de Kayser (1953) qui montre que, si le froid modifie la thyroïde du Rat blanc, il n'a pas d'action sur celle des mammifères hibernants. La Grenouille, poïkilotherme, se comporterait comme un non hibernant ; il est juste, cependant, de dire que Fontaine et Lachiver (1955) pensent, contrairement à Kayser, que la thyroïde intervient chez les hibernants.

En résumé, sous l'influence simultanée du froid et de l'obscurité, on peut constater les modifications suivantes de la structure thyroïdienne :

- fluidification et décharge transcellulaire de la colloïde ;
- hydratation du pôle apical des cellules qui deviennent turgescentes : vacuoles de résorption nombreuses dans la colloïde ;
- hyperplasie végétante par mitose et amitose ;
- accoutumance et retour à un stade de repos.

Si l'on compare les animaux placés au froid et à l'obscurité combinés et ceux disposés à l'obscurité à une température de 8 à 10°C, il ressort que l'obscurité qui règne dans le réfrigérateur ne semble pas avoir modifié considérablement nos résultats car elle produit, nous l'avons vu, une alternance de périodes d'activité de faible amplitude seulement et de repos.

Ainsi, sous l'influence du froid, on peut constater une activation marquée de la thyroïde qui se traduit par les nombreuses vacuoles qui apparaissent dans la colloïde, la hauteur des cellules, la formation de nombreux microfollicules, etc... Cette activation cesse au bout d'un certain temps et la thyroïde fait retour à un stade de repos.

C H A P I T R E III

-=-=-=-=-=-=-

VARIATIONS DE LA CALCEMIE ET DE LA PHOSPHOREMIE

ETUDE CORRELATIVE DE DIFFERENTS FACTEURS

De nombreuses études sur la fonction parathyroïdienne, chez les Mammifères, ont établi le rôle de la glande sur l'homéostasie du calcium et du phosphore. La parathyroïdectomie produit, habituellement, une diminution du calcium sanguin et du phosphore inorganique urinaire, une augmentation du phosphore sanguin et du calcium urinaire. L'injection de l'hormone parathyroïdienne a, le plus souvent, un effet opposé à celui de la parathyroïdectomie.

Peu d'études ont été effectuées sur la fonction parathyroïdienne des autres Vertébrés. Toutefois, les travaux récents indiquent une variabilité de la fonction des parathyroïdes suivant les espèces.

Les Poissons ne semblent pas posséder de parathyroïdes. Ils sont, cependant, capables de maintenir constant le taux du calcium sanguin (Urist 1963). Le mécanisme qui permet aux Poissons de contrôler le taux du calcium n'est pas connu, quoique l'on sache que le corps ultimobranchial intervient en sécrétant la calcitonine (Copp, 1968). Fontaine (1964) pense que l'ablation des corpuscules de Stannius de l'Anguille conduit à une hypercalcémie. Le taux normal de calcium peut être rétabli par l'injection de ces glandes. Clark *et al* (1963) ont montré que l'hormone parathyroïdienne de Mammifères ne modifie pas le taux de calcium chez les Poissons.

C'est chez les Amphibiens que, au cours de la phylogenèse, les parathyroïdes apparaissent sous la forme de cellules organisées en glandes. Elles sont connues, cependant, depuis de nombreuses années. Maurer, en 1888, les a décrites sous le nom de "Epithelkörperchen". Chez les Anoures, Maurer a mis en évidence deux paires de parathyroïdes. Elles dérivent, embryologiquement, de la face ventrale de la troisième et de la quatrième poche branchiale, alors que le thymus provient de la face dorsale. Elles ont un aspect brillant et globuleux qui permet de les distinguer des globules de graisse auxquels elles sont associées.

Les premiers travaux sur les parathyroïdes des Amphibiens leur ont attribué des rôles divers tels que le contrôle de la pigmentation, les retards de la croissance (Thompson *et al*, 1934) un rôle

complémentaire des thyroïdes (Uhlenhuth, 1918, 1921) une diminution de l'activité cardiaque (Takacs, 1927). Les recherches ultérieures ont montré que chez certains Amphibiens, les parathyroïdes, comme chez les Mammifères, pouvaient diriger le métabolisme minéral. Leur étude peut conduire à mettre en évidence la tendance du mécanisme hormonal de la régulation calcique chez les Vertébrés. Mais peu d'études ont été faites à ce sujet. Nous avons donc entrepris de rechercher les variations de la calcémie et de la phosphorémie en relation avec les parathyroïdes.

Nous n'avons pas étudié la calciurie ni la phosphaturie parce que, chez la Grenouille, l'urine est contaminée par les fèces. D'autre part, il y a au niveau de la vessie des échanges d'eau difficiles à contrôler. Elle représente, en effet, un organe de mise en réserve de l'eau (Ewer, 1952, Heller, 1965) qui peut être réabsorbée si les conditions sont telles que l'animal perd de l'eau par la peau. Cette perte est retardée par une élévation de la concentration de l'urine, une diminution du volume urinaire (Sawyer, 1957). Scheer (1965) et Deyrup (1964) ajoutent qu'une résorption du sodium et d'autres ions peut se produire au niveau de la vessie. Il est ainsi possible que les dosages du calcium et du phosphore soient entachés d'erreurs.

A) STRUCTURE HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE DES PARATHYROÏDES

L'histologie et la cytologie des parathyroïdes ont été très étudiées chez les Mammifères et les Oiseaux. Depuis quelques années,

on pense qu'il existe dans leur parathyroïde deux variétés de cellules principales : les unes "claires", les autres "sombres". On admet que ces deux variétés correspondent à des états fonctionnels différents d'un même type cellulaire. A leur côté, on trouve parfois, comme chez l'Homme, des cellules "oxyphiles" éosinophiles. Parfois, un produit ressemblant à de la colloïde thyroïdienne s'accumule entre quelques cellules. Cette colloïde ne contient pas d'iode mais une mucoprotéine neutre.

Chez les Amphibiens, la structure des parathyroïdes est variable. Ainsi, chez *Rana clamitans*, il semble certain qu'il existe des cellules claires et des cellules sombres (Rogers, 1965) comme chez les Mammifères et les Oiseaux. Chez *Rana esculenta*, on ne trouve qu'une seule catégorie de cellules avec un cytoplasme clair (fig. 24). Il n'y a ni cloisons, ni sinus, ni capillaires. Chaque glande est enveloppée dans une capsule conjonctive. Les capillaires se trouvent à la surface de la glande contrairement à ce qui se passe chez le Crapaud, chez lequel ils pénètrent à l'intérieur de la glande (Boschwitz, 1961). On peut dire que la parathyroïde de *Rana esculenta* est la plus primitive du point de vue anatomique et cytologique. Les cellules sont allongées en fuseau avec un gros noyau riche en chromatine. Leur surface est lisse. Elles sont serrées les unes contre les autres.

Montsko *et al* (1963) ont confirmé par une étude en microscopie électronique l'existence d'un seul type morphologique cellulaire, ainsi que l'absence de capillaires ou de cloisons, contrairement à ce

Figure 24.

Coupe de la glande parathyroïde

que Rogers (1965) a montré chez *Rana clamitans*. Des discontinuités peuvent apparaître dans la membrane cellulaire. Le noyau est très volumineux. Il a une structure homogène et contient un ou deux nucléoles à structure fine. L'ergastoplasme est vésiculeux, les mitochondries très nombreuses, et l'appareil de Golgi lamelleux ou vésiculeux. Le cytoplasme contient deux types de vésicules entourées d'une membrane : des vésicules vides et des vésicules remplies d'une substance légèrement osmiophile qui seraient des grains de sécrétion. Des gouttelettes lipidiques sont localisées au voisinage du noyau. Elles sont très osmiophiles et ne possèdent pas de membrane. Montsko *et al* (1963) pensent que l'appareil de Golgi a un rôle indirect en produisant des vésicules vides ; ces dernières sont remplies dans le cytoplasme, soit de l'hormone, soit de son précurseur. Puis les vésicules se transforment en grains de sécrétion denses et au diamètre augmenté.

Waggener (1929) a décrit des variations saisonnières chez *Rana castesbeiana* : pendant l'hiver, les parathyroïdes dégénèrent. Il y a formation d'un noyau picnotique, vacuolisation, perte de l'intégrité de la structure cellulaire excepté pour les cellules qui se trouvent sur la bordure de la glande. Au microscope, ces glandes ont un aspect réticulé. A l'approche de l'été, ces cellules lysées sont remplacées par des cellules provenant de la multiplication de celles qui sont restées intactes. Von Brehm (1963) dénie l'existence de changements saisonniers chez *Rana temporaria*. Mais en 1964, il trouve

que la température agit sur la structure de la glande ; cependant toutes les parathyroïdes d'un même animal ne sont pas au même état d'activité, ce qui semble contredire l'influence possible des saisons.

Chez *Salamandra atra* et *Salamandra maculosa*, Scholz (1933) a observé des dégénérescences de la parathyroïde. Il les attribue à la captivité plus qu'aux changements saisonniers.

Chez *Rana esculenta*, les variations saisonnières sont pratiquement nulles chez des animaux fraîchement capturés (Montsko *et al*, 1963).

Nous n'avons jamais trouvé de cellules de dégénérescence chez des *Rana esculenta* dont les parathyroïdes ont été fixées immédiatement après le prélèvement dans les mares. Par contre, nous avons relevé quelques cellules lysées chez des Grenouilles conservées en captivité. Aussi, nous pensons, comme Scholz, que ces variations résultent, chez certaines espèces, de la captivité et non de changements saisonniers. Ces résultats ont été également retrouvés chez le Crapaud (Boschwitz, 1967). Nous n'avons pas vu de trace de vacuolisation ni de régénération. Nous n'avons jamais observé d'hypertrophie des glandes. Les changements de la parathyroïde en captivité résultent de facteurs inconnus. En captivité, les animaux sont exposés à un environnement différent de celui qu'ils connaissent habituellement : changement de température, de taux hygrométrique, de nourriture. Dans la nature, ils peuvent, en partie, échapper aux variations de ces facteurs en se cachant.

B) VARIATIONS SAISONNIERES DE LA TENEUR EN CALCIUM ET EN PHOSPHORE DU PLASMA

Comparé à ce qui se passe pour l'eau et les électrolytes monovalents (K^+, Na^+, Cl^-), les changements dans la concentration du calcium et du phosphore dans le sang sont plus lents et moins spectaculaires. Peu d'observations ont été faites à leur sujet dans la nature.

1) Protocole expérimental

Nous effectuons nos dosages sur des Grenouilles élevées dans des mares. Tous les 2 mois, sauf en février où des prélèvements ont été également effectués, nous prenons, dans chacune des mares, 6 animaux. L'eau de l'une de ces mares (que nous appellerons "mare A") a une dureté calcique de 262,5 ppm. L'autre mare ("mare B") a une dureté calcique de 17,1 ppm.

2) Résultats

Nous avons trouvé des résultats comparables dans les deux mares (fig. 25 & 26). Après la période froide de l'hiver, la teneur en calcium du plasma des Grenouilles est élevée dans les deux cas. Puis elle diminue pour atteindre son taux le plus bas en juin, juillet et août. Il faut, cependant, remarquer qu'elle semble diminuer plus rapidement chez les animaux vivant dans la "mare A" que chez ceux de la "mare B" (fig. 27). Les taux les plus élevés et les plus bas sont comparables. Par contre, nous n'avons pas remarqué de modifications significatives du phosphore inorganique au cours de l'année. Ce taux s'est maintenu à 3,2 ± 0,9 mg/100 ml.

En résumé, les plus fortes valeurs se trouvent lorsque les Grenouilles ont subi la période froide.

Figure 25.

Variations annuelles de la calcémie

exprimée en mg/100 ml

chez *Rana esculenta*

Mare "A" : dureté calcique 262,5 ppm.

MOIS	1	2	3	4	5	6	Moyenne	Erreur type de la moyenne
JANVIER	6,5	6,9	5,0	6,2	6,4	5,8	*6,1*	0,6
FEVRIER	7,0	7,5	7,2	7,7	8,0	7,4	*7,5*	0,5
MARS	7,0	6,4	6,8	7,0	6,4	6,3	*6,6*	0,3
MAI	4,5	5,0	6,0	5,2	4,3	5,0	*5,0*	0,6
JUILLET	5,5	4,5	5,1	4,4	4,2	5,0	*4,8*	0,5
SEPTEMBRE	6,0	5,9	4,4	6,1	5,8	5,5	*5,6*	0,6
NOVEMBRE	5,2	6,1	5,5	5,7	5,3	6,3	*5,7*	0,5

Figure 26.

Variations annuelles de la calcémie

exprimée en mg/100 ml

chez *Rana esculenta*

Mare "B" : dureté calcique 17,1 ppm.

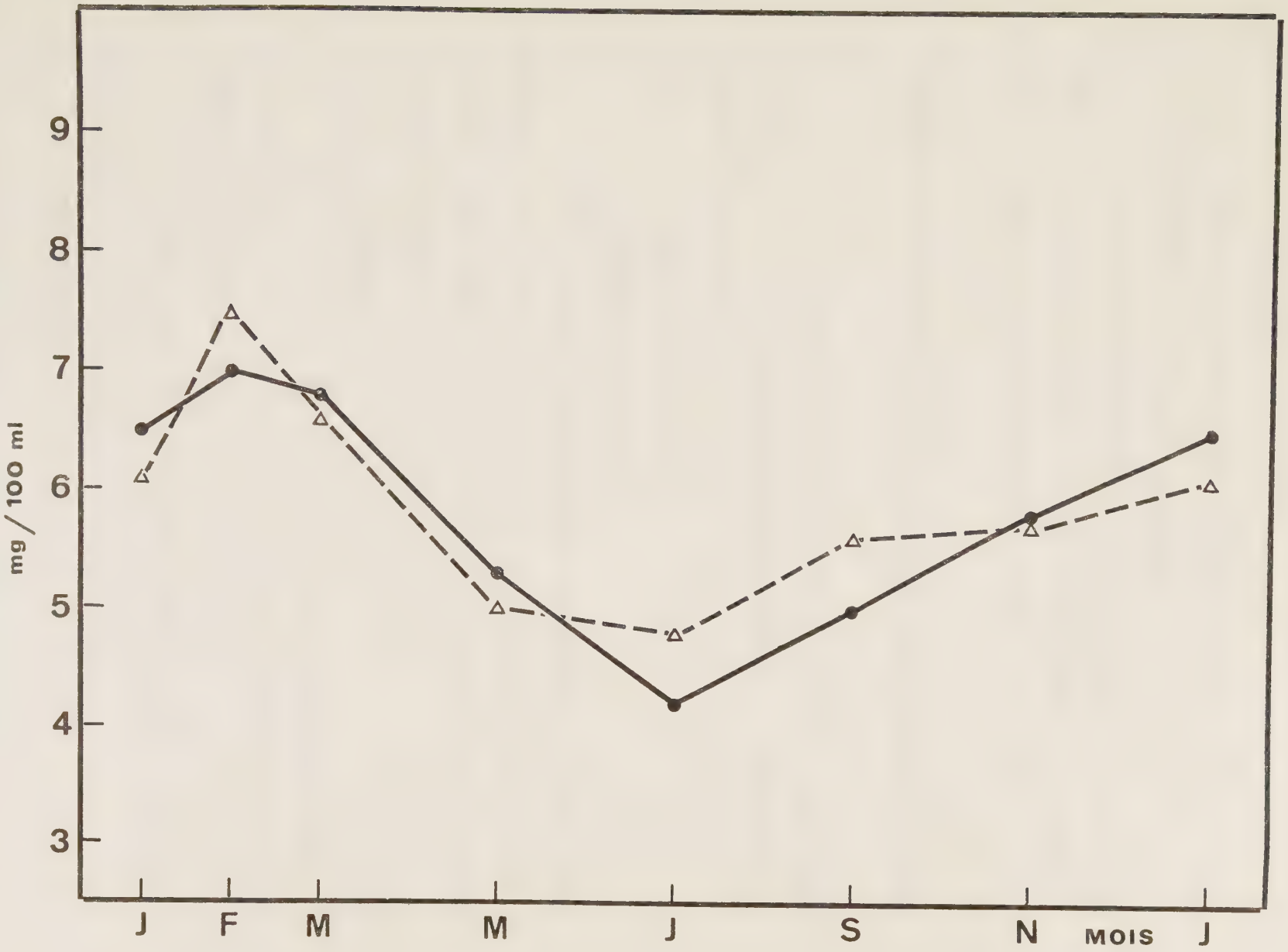
MOIS	1	2	3	4	5	6	Moyenne	Erreur type de la moyenne
JANVIER	6,7	5,7	7,5	6,4	5,8	6,9	*6,5*	0,6
FEVRIER	6,0	7,1	6,9	7,5	7,0	7,1	*7,0*	0,6
MARS	7,0	6,2	7,0	6,8	7,2	6,5	*6,8*	0,4
MAI	5,2	5,0	4,8	5,1	5,4	6,3	*5,3*	0,5
JUILLET	4,5	3,9	4,0	3,9	3,7	5,3	*4,2*	0,6
SEPTEMBRE	4,9	5,4	5,0	5,1	4,8	5,0	*5,0*	0,2
NOVEMBRE	5,0	5,7	6,0	5,9	6,1	6,4	*5,8*	0,5

Figure 27.

Variations annuelles du calcium plasmatique

Mare "A" (dureté calcique : 262,5 ppm).

Mare "B" (dureté calcique : 17,1 ppm).


9
8
7
6
5
4
3
mg / 100 ml
J
F
M
M
J
S
N
MOIS
J

3) Discussion

Duguy (1970) signale chez *Vipera aspis* que la concentration en calcium atteint son maximum au printemps.

Ces résultats diffèrent de ceux de Jenkin (1962) qui montre chez *Xenopus laevis* des variations saisonnières dans le calcium du sérum : le taux est plus élevé lorsque le jour est le plus long.

C) ACTION DE L'OBSCURITE ET DU FROID SUR LE TAUX DE CALCIUM DU PLASMA

A la suite des variations saisonnières que nous avons mises en évidence, nous avons voulu savoir quels étaient les rôles respectifs de l'obscurité et du froid.

1) Action de l'obscurité

a) Protocole expérimental

Début décembre, des Grenouilles sont placées au laboratoire dans des bocaux individuels, à 22°C et à l'obscurité, dans de l'eau provenant d'un échangeur d'ions. Elles sont nourries de vers de vase. Le sang est prélevé à la fin du mois de février.

b) Résultats

Le taux de calcium, les animaux étant nourris normalement, atteint la valeur de 5,0 ± 0,4 mg/100 ml tandis que celui du phosphore inorganique se maintient à 3,2 ± 1,2 mg/100 ml.

En résumé, chez *Rana esculenta*, l'influence de l'obscurité semble nulle.

c) Discussion

c) Discussion

Chez les Oiseaux, l'obscurité stimule les parathyroïdes, (Jenkin, 1962).

Par contre, Waggener (1930) chez *Xénopus* pense que le taux du calcium est plus élevé quand les jours sont les plus longs.

2) Action du froid

a) Protocole expérimental

Les Grenouilles séjournent dans des eaux de qualités différentes. Elles sont prélevées en février et en juin dans l'une des mares et réparties en lots de 6. Elles sont soumises à une température de 4°C dans un réfrigérateur où le rythme nycthéméral normal de l'éclairement est reproduit grâce à une lampe fluorescente Philips TLS, à allumage instantané de 20 W, "lumière du jour de luxe", commandée par un interrupteur horaire. Leur température interne est de 5°C.

b) Résultats

→ Eau provenant d'un échangeur d'ions.

En février, au bout de 15 jours, le taux de calcium plasmatique atteint 7,9 ± 0,7 mg/100 ml, celui du phosphore inorganique étant de 2,8 ± 0,9 mg/100 ml.

En juin, au bout de 15 jours, le calcium plasmatique est de 7,5 ± 0,5 mg/100 ml, celui du phosphore inorganique n'étant pas modifié.

→ Solutions de chlorure de calcium.

Témoins. Ils sont à la température du laboratoire.

Solution à 10 % ou à 5 % de $CaCl_2$

La mortalité est totale quelle que soit la saison.

Solution à 1 % de $CaCl_2$

. Expériences effectuées en juin :

- Séjour de 3 jours : il y a une légère augmentation par rapport aux valeurs trouvées chez des animaux vivant à la même époque dans la mare. On trouve une valeur de 5,5 ± 0,3 mg/100 ml.
- Séjour de 5 jours : cette valeur a peu varié, elle est de 5,7 ± 0,4 mg/100 ml.
- Séjour de 8 jours : le taux du calcium plasmatique est alors de 6,1 ± 0,3 mg/100 ml.
- Séjour de 15 jours : le calcium sérique atteint alors 6,7 ±0,4 mg/100 ml.

En résumé, la présence de chlorure de calcium produit une augmentation notable par rapport aux animaux vivant dans la mare à la même saison.

. Expériences effectuées en février :

- Séjour de 3 jours : on trouve 7,4 ± 0,4 mg/100 ml.
- Séjour de 5 jours : la calcémie atteint 7,8 ± 0,5 mg/100 ml.
- Séjour de 8 jours : le taux de calcium plasmatique est de 8,4 ± 0,5 mg/100 ml.
- Séjour de 15 jours : la valeur de la calcémie atteint 8,9 ± 0,6mg/100 ml.

En résumé, les résultats obtenus sont comparables quelle que soit la saison de l'année. Ces expériences ne semblent pas modifier le phosphore inorganique plasmatique puisqu'il se maintient à 2,9 ± 0,8 mg/100 ml. Ces traitements n'ont pas d'effet sur l'histologie de la parathyroïde.

Expériences au froid.

Solution à 10 % ou à 5 % de $CaCl_2$

La mortalité est totale au bout de 24 heures, quelle que soit l'époque de l'année où l'expérience est réalisée. Ces résultats confirment ceux de PRZYLECKI (1922) : les Batraciens ne peuvent vivre dans un milieu riche en électrolytes. Les causes de cette mortalité restent inexpliquées. On constate seulement une légère augmentation du poids de l'animal et du volume de l'abdomen.

Solution à 1 % de $CaCl_2$

- Séjour de 3 jours : en juin, dès le 3e jour, le taux de calcium sanguin est de 6,0 ± 0,3 mg/100 ml. En février, cette valeur est de 7,8 ± 1 mg/100 ml.
- Séjour de 5 jours : en juin la calcémie atteint 7,3 ± 1,2 mg/100 ml, tandis qu'en février, au bout du 5e jour, elle est de 12 ± 1,5 mg/100 ml.
- Séjour de 8 jours : le taux de calcium atteint en juin 15 ± 3 mg/100 ml. En février, la valeur est comparable, elle est de 15,9 ± 2,5 mg/100 ml.
- Séjour de 15 jours : tous les animaux meurent quelle que soit la saison. Les glandes calcarifères sont alors de grande taille.

En résumé, le froid élève considérablement la calcémie et l'homéostasie ne semble plus s'effectuer.

D) INFLUENCE DE LA PARATHYROÏDECTOMIE SUR LA CALCEMIE

A la suite de divergences de résultats entre *Rana catesbeiana* et les autres Amphibiens parathyroïdectomisés, nous avons attaché une

attention particulière aux conséquences de la parathyroïdectomie.

1) Protocole expérimental

Les animaux, répartis en lots de 4, sont placés dans des bocaux de 2 litres. Ils sont nourris. Les animaux parathyroïdectomisés, conservés pendant plusieurs mois, ont été maintenus dans des cages en plastique placées dans la mare "B".

Des Grenouilles sont opérées à blanc, c'est-à-dire qu'elles subissent les différents stades de la parathyroïdectomie, mais les parathyroïdes ne sont pas prélevées.

Pour vérifier que la parathyroïdectomie est complète, nous effectuons des coupes sériées dans toute la région du larynx. Les sections sont examinées pour déterminer le degré de succès de l'opération et, en plus, pour voir s'il n'y a pas de tissu parathyroïdien ectopique ou de régénération.

2) Résultats

a) Grenouilles opérées à blanc

On ne trouve pas de variations significatives par rapport aux témoins élevés dans les mêmes conditions quelle que soit la période de l'année où l'intervention est effectuée.

b) Grenouilles parathyroïdectomisées

Température du laboratoire

Les Grenouilles sont placées dans des bocaux contenant de l'eau provenant d'un échangeur d'ions. Elles ne présentent pas d'activité nerveuse spontanée visible à l'oeil nu telle que crispations ou contractions cloniques, même au bout de deux mois. Le comportement des Grenouilles opérées ne diffère pas de celui des témoins. Toutes

les Grenouilles survivent jusqu'au jour du prélèvement du sang. Elles sont toutes en bonne condition et actives. Nous ne remarquons pas de modifications macroscopiques du squelette ou des glandes calcarifères. Pour faire quelques observations sur les possibilités de régénération des os, le calcaneum a été cassé chez certaines des Grenouilles parathyroïdectomisées. Le taux de soudure des os chez les animaux de ce groupe ne diffère pas de celui des témoins. La formation des cals osseux se termine par une calcification normale. La durée moyenne de la formation du cal chez les animaux parathyroïdectomisés n'est pas supérieure à celle des témoins et n'excède pas 4 mois. Il n'y a pas de modification des organes internes. Les poumons et les reins sont normaux morphologiquement. Les changements pathologiques, observés chez les Mammifères, ne se retrouvent pas chez les Grenouilles opérées.

Le taux de calcium reste similaire à celui des animaux normaux; il n'y a pas de changement significatif de ce taux après parathyroïdectomie, quelle que soit la saison. Les résultats sont récapitulés dans les figures 28 & 29.

Action du froid

Les Grenouilles parathyroïdectomisées au mois de juin sont placées dans un réfrigérateur, où le rythme nycthéméral est conservé, dans des solutions variées.

Les animaux, dont nous avons étudié précédemment le comportement à 4°C servent de témoins.

Solution à 10 % et 5 % de chlorure de calcium

La mortalité est totale au bout de 24 heures.

Figure 28.

- FEVRIER -

Effets de la parathyroïdectomie

sur des Grenouilles, à 18° C.

Témoins

Parathyroïdectomisés

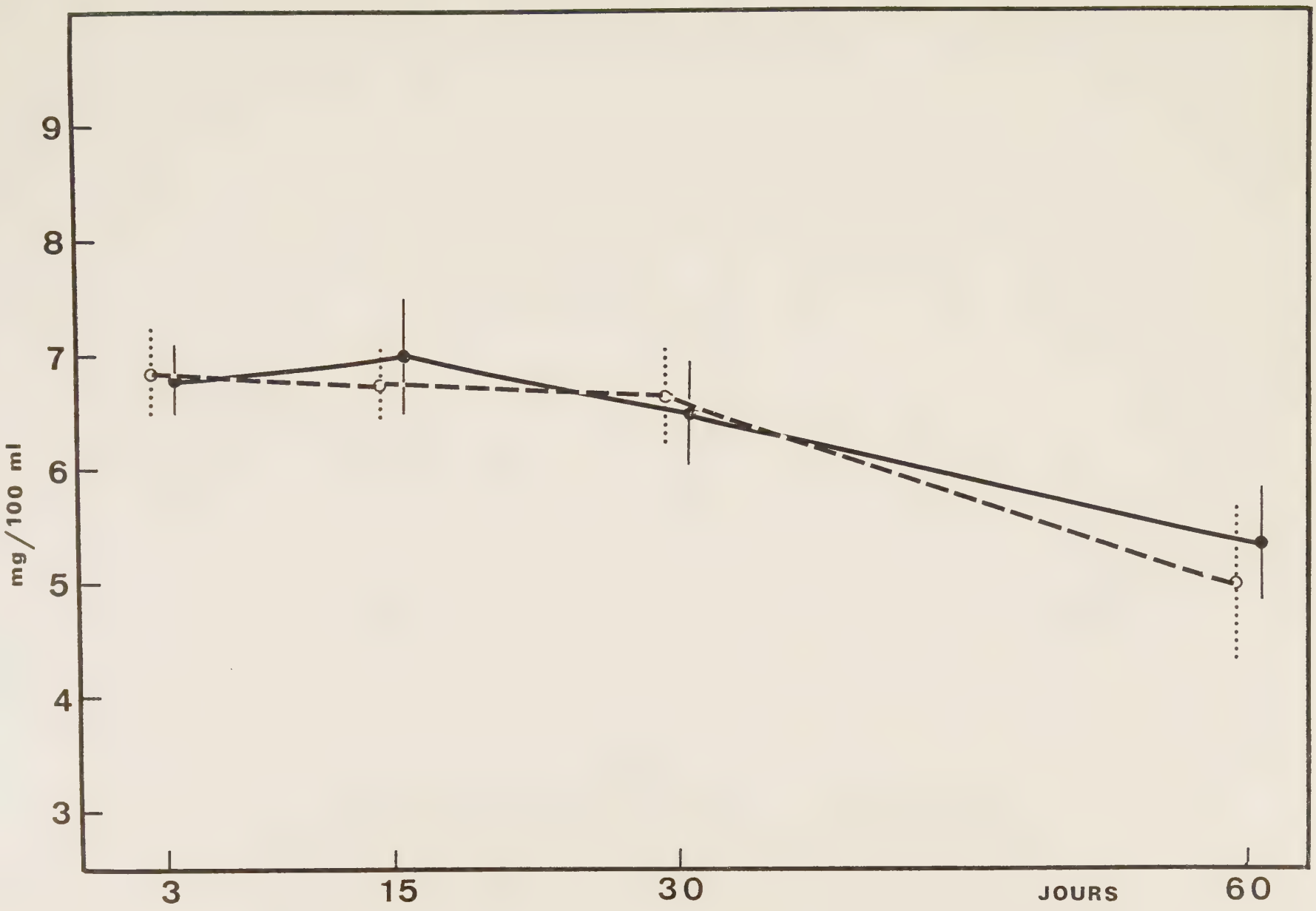

9
8
7
6
5
4
3
mg/100 ml
3
15
30
JOURS
60

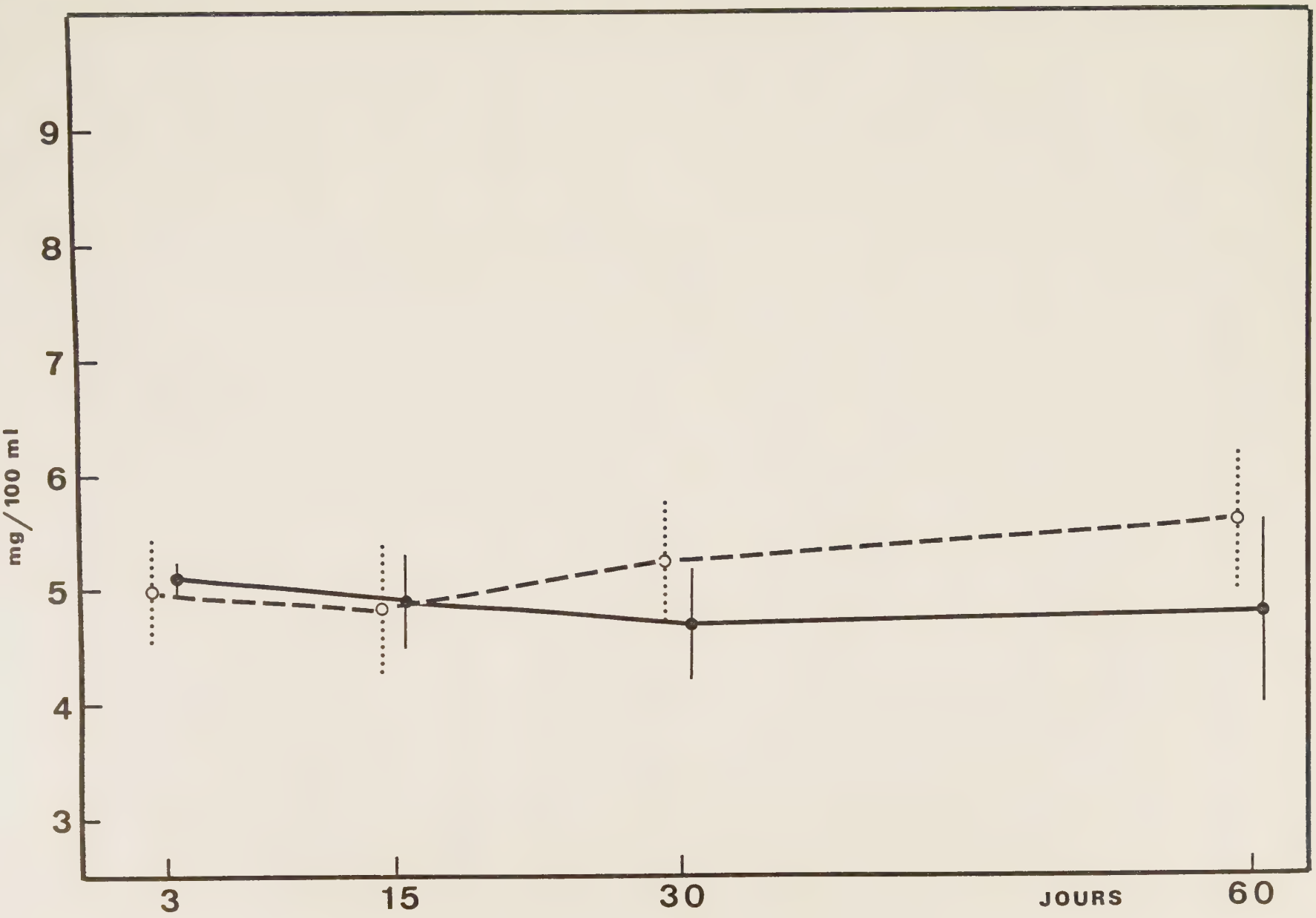
Figure 29.

- JUIN -

Effets de la parathyroïdectomie
sur des Grenouilles, à 18° C.

Témoins

Parathyroïdectomisés


9
8
7
6
5
4
3
mg/100 ml
3
15
30
JOURS
60

Solution à 1 % de chlorure de calcium

Nous retrouvons les mêmes résultats que chez les Grenouilles témoins (fig. 30).

En résumé, nous n'obtenons jamais d'hyperexcitabilité neuromusculaire ou de convulsions tétaniques, même au bout de plusieurs jours ou de plusieurs mois. Nos Grenouilles parathyroïdectomisées ne présentent aucun des symptômes d'hypoparathyroïdisme décrits par Waggener (1930) chez *Rana catesbeiana*. Nous observons seulement une légère modification du métabolisme calcique. Le calcium plasmatique est réduit. La saison où est effectuée l'intervention n'a pas d'importance. Le phosphore inorganique ne varie pas et reste au voisinage de 3,5 ± 1,1 mg/100 ml.

3) Discussion

Chez *Salamandra atra* et *Salamandra maculosa*, Scholz (1933) n'observe pas de signes d'hyperexcitabilité neuromusculaire.

Par contre, Kuffler (1945) trouve quelque hyperexcitabilité chez *Hyla aurea*, mais pas d'hypocalcémie.

Romeis (1926) n'observe pas d'activité nerveuse spontanée chez des *Rana temporaria* parathyroïdectomisées.

Waggener (1930), chez *Rana catesbeiana*, montre que l'extirpation totale de la glande est suivie de contractions tétaniques et la mort survient dans les 4 jours à moins qu'une thérapie de remplacement soit instituée. Le taux de calcium sanguin diminue de 40 %.

Zhenevskaya (1948) n'a pas trouvé de modifications du calcium sanguin chez *Rana ridibunda*. Chez *Rana temporaria*, elle

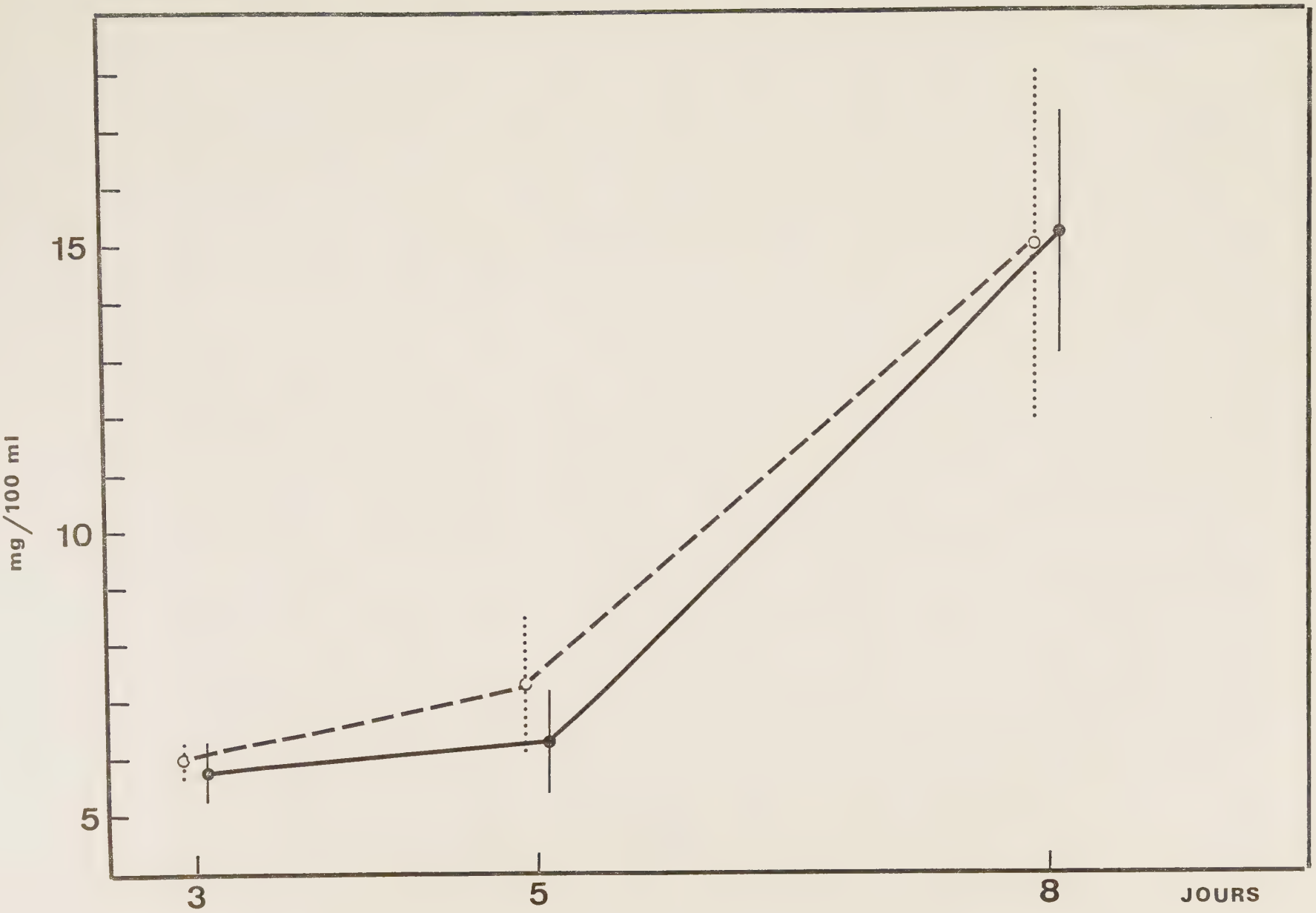
Figure 30.

Effets de la parathyroïdectomie

sur des Grenouilles à 4° C.

Témoins

Parathyroïdectomisés


15
10
5
mg /100 ml
3
5
8
JOURS

observe une très légère hypocalcémie.

Pour Pickfort *et al* (1957), les parathyroïdes ne sont pas essentielles à la vie chez les Anoures. *Rana pipiens* survit à une extirpation complète des glandes sans signe de tétanie.

Pour Cortelyou *et al* (1960), la parathyroïdectomie chez *Rana pipiens* produit une hypocalcémie. Cette diminution est de 40 à 50 % en 2 semaines. Cependant, l'effet de la parathyroïdectomie n'est pas permanent. Le taux normal du calcium se rétablit progressivement et fait retour à la limite la plus basse du taux normal. Certains Mammifères parathyroïdectomisés montrent également une tendance à revenir au taux normal, mais l'augmentation est plus rapide. Cortelyou n'observe pas de signes de tétanie ni de mortalité. Les variations du taux de calcium chez les parathyroïdectomisées ressemblent à celles signalées chez les Mammifères, mais l'amplitude de ces variations est beaucoup plus réduite chez les Amphibiens que chez les Mammifères. Cortelyou signale également une hypercalciurie, mais il ne peut l'expliquer.

Boschwitz (1961) signale que, après parathyroïdectomie, des *Bufo viridis* se remettent rapidement du choc opératoire. Ils reviennent à leur position normale après quelques minutes et se remuent comme avant. Ils attrapent des mouches après 2 ou 3 jours quand la blessure est fermée superficiellement. Une quinzaine de jours plus tard, on voit peu ou pas de tissu cicatriciel. Mais des spasmes tétaniques plus ou moins sévères s'installent progressivement

le 2e jour. Cependant, la mort ne survient pas. Boschwitz pense qu'il y a pénétration du calcium à travers la peau. La fréquence de la tétanie s'en trouve diminuée. La position favorite de l'animal étalé sur son ventre quand il est parathyroïdectomisé, pourrait permettre une compensation. La surface de contact avec l'eau est augmentée. En conséquence, les quantités d'oxygène et de calcium transférées dans l'organisme sont augmentées.

Houston *et al* (1965) chez *Rana catesbeiana* rapportent que la parathyroïdectomie conduit à une augmentation de 100 % du phosphore inorganique plasmatique, 6 jours après l'ablation de la glande. Pour eux, la fonction de la parathyroïde est la même chez les Anoures que chez les Mammifères.

Cortelyou *et al* (1967) signalent chez *Rana pipiens*, après parathyroïdectomie, une augmentation du phosphore inorganique qui peut excéder 78 %. Puis, il y a retour progressif à des valeurs normales. Pour ces auteurs, les variations du calcium plasmatique et celles du phosphore inorganique qu'ils observent semblent être des événements indépendants. D'ailleurs, ils admettent l'hypothèse que l'hormone parathyroïdienne n'agit pas sur l'os mais induit l'accumulation du phosphate dans les mitochondries des parties molles.

Mais Beutner *et al* (1960) ont montré également une hyperphosphaturie chez des Rats opérés à blanc. Chez *Rana pipiens*, l'hyperphosphaturie pourrait peut-être résulter de ce même traumatisme.

De cette discussion, il ressort que l'effet de la parathyroïdectomie est très contreversé chez les Anoures. Ces discordances sont certainement dues à des variations de comportement selon les

espèces. On doit également ajouter qu'aucun dosage n'a été effectué chez des animaux opérés à blanc. Aussi, est-il possible que certaines modifications décrites soient dues plus à l'opération elle-même qu'au prélèvement des parathyroïdes. En effet, nous avons remarqué que l'hémorragie conduit à une chute brusque du calcium du plasma de 0,5 à 1 mg/100 ml. Aussi, nous éliminons les Grenouilles qui saignent pendant l'ablation des parathyroïdes. D'autre part, des facteurs inconnus, tels que le maintien des animaux en captivité, les prélèvements de sang répétés, la manipulation des animaux peuvent intervenir. Beaucoup de possibilités peuvent expliquer le manque de réponses à la parathyroïdectomie que nous avons observé. *Rana esculenta* possède peut-être un mécanisme spécial pour prélever le calcium dans l'eau environnante ou encore ses glandes calcarifères lui servent peut-être de lieu de stockage. En effet, chez les Anoures, le problème du dépôt du calcium est compliqué par la présence de quantités variables de calcium dans les glandes calcarifères dont nous aurons l'occasion de reparler plus loin.

E) ADMINISTRATION D'EXTRAITS PARATHYROÏDIENS

Chez les Mammifères, l'hormone parathyroïdienne (P. T. H.) régularise le calcium plasmatique (Stewart *et al*, 1951, Talmage *et al*, 1953) et celui de l'urine (Talmage *et al*, 1954, 1955). Comme la parathyroïdectomie, l'administration d'extraits parathyroïdiens aux Batraciens conduit à des résultats différents.

1) Protocole expérimental

Réparties par lots de 6, au mois de juin, les Grenouilles sont placées dans des bocaux contenant des eaux de qualités différentes. Elles ne sont pas nourries pendant l'expérience. Elles reçoivent 10 ou 30 unités U. S. P. (1) de parathormone Lilly d'origine bovine, conservée au réfrigérateur à 4° C. Les animaux sont placés, soit à la température ambiante, soit à 4° C dans un réfrigérateur où le rythme nycthéméral est conservé.

Des témoins sont mis dans les mêmes conditions (fig. 31, 32, 33, 34).

Des lots de Grenouilles ont subi des injections équivalentes d'eau stérilisée et apyrogène contenant 0,2 % de phénol (fig. 31, 32, 33 & 34).

2) Résultats

a) A la température ambiante

Les Grenouilles sont dans des bocaux contenant, sur une hauteur de 2 cm, une solution à 1 % de $CaCl_2$.

Il semble que l'injection de 10 ou de 30 unités U. S. P. produise une augmentation du calcium plasmatique d'environ 20 % (fig. 31 & 32). Cette augmentation se maintient pendant 48 heures, mais les valeurs extrêmes sont très différentes. On trouve, 6 heures après

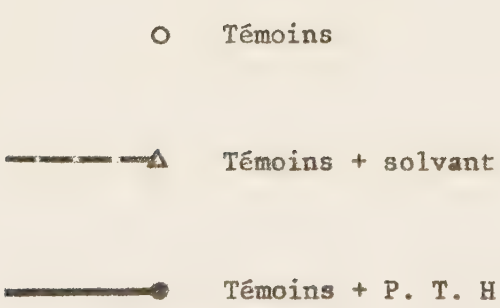
---

(1) Une unité U. S. P. de parathormone est le centième de la quantité nécessaire pour élever de 1 mg, 16 à 18 heures après l'injection, le calcium de 100 ml de sérum sanguin de chien mâle adulte pesant entre 10 et 12 kg.

Figure 31.

Effets de l'injection de 10 unités U. S. P.

P. T. H. sur la calcémie de Grenouilles à 18° C.



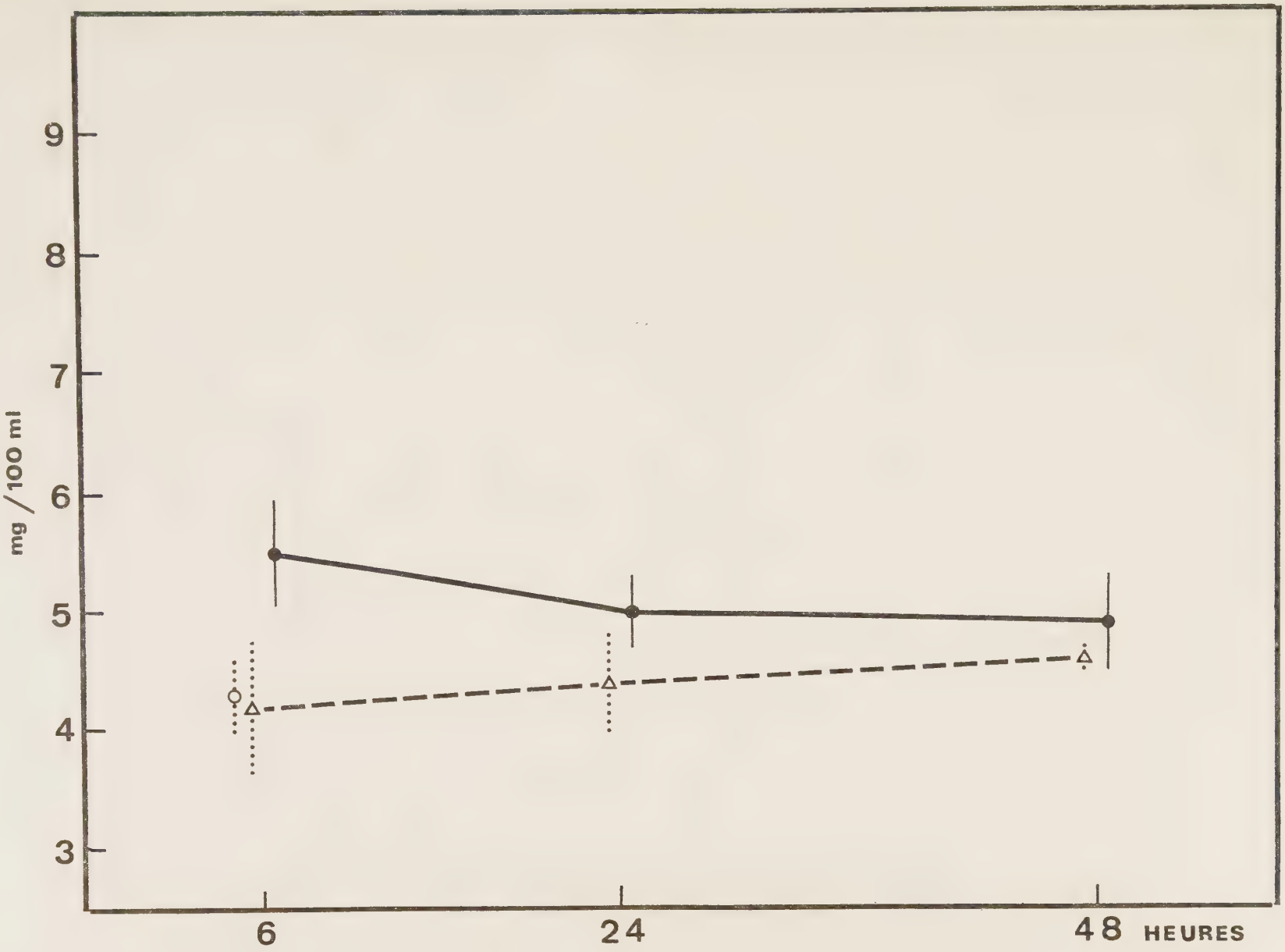
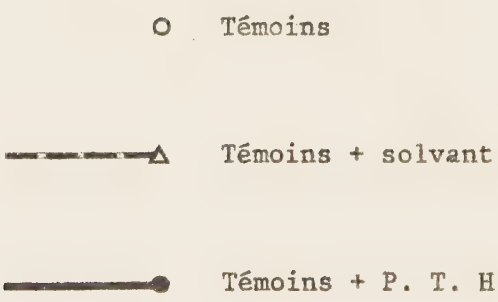

9
8
7
6
5
4
3
mg /100 ml
6
24
48 HEURES

Figure 32.

Effets de l'injection de 30 unités U. S. P.

de P. T. H. sur la calcémie de Grenouilles à 18° C.



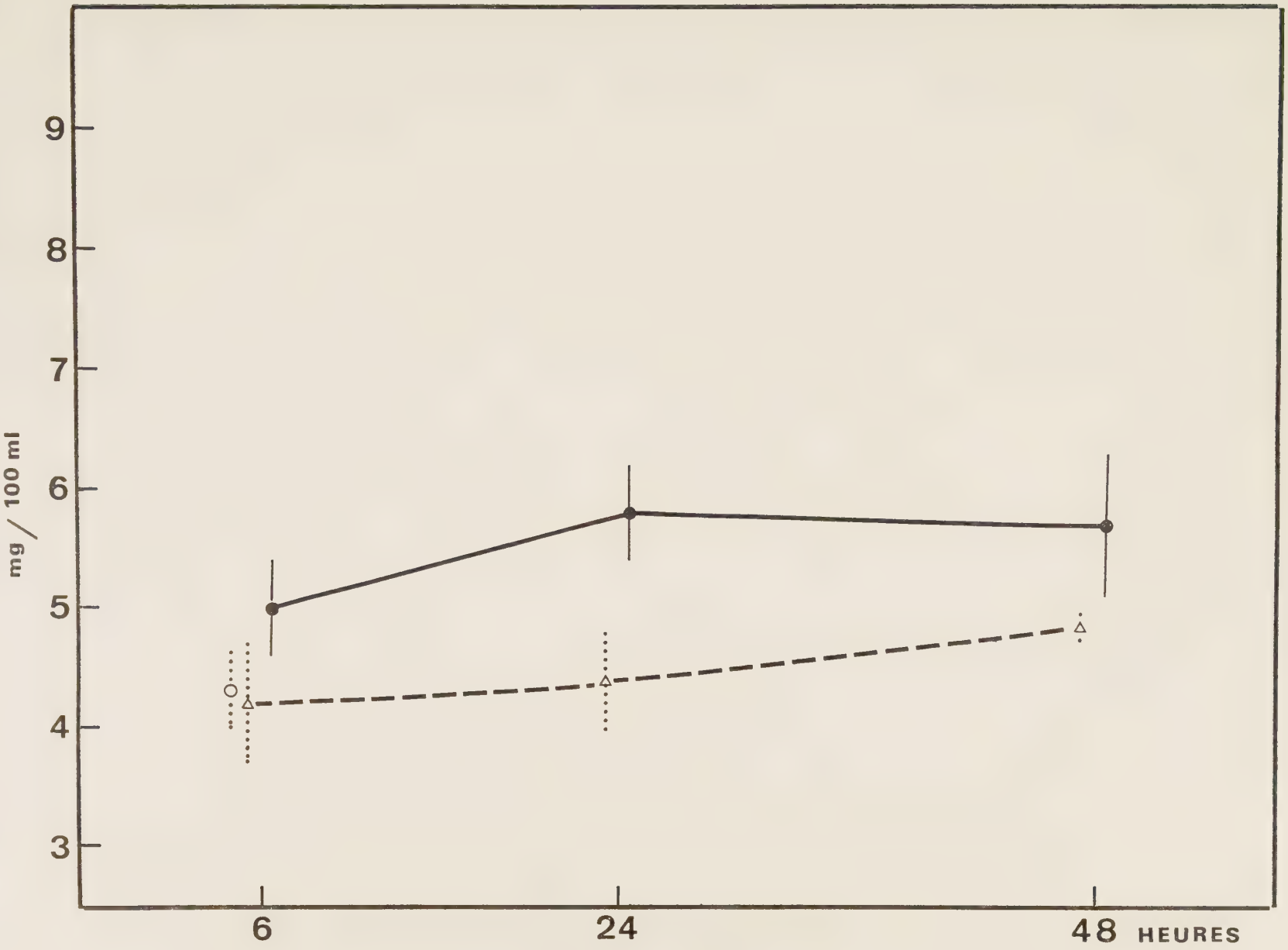
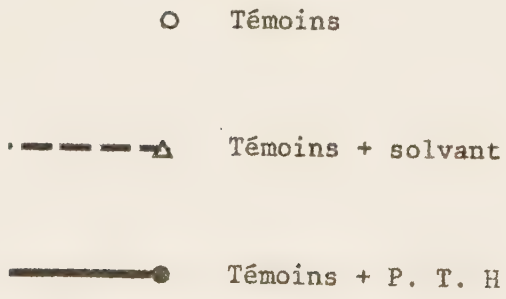
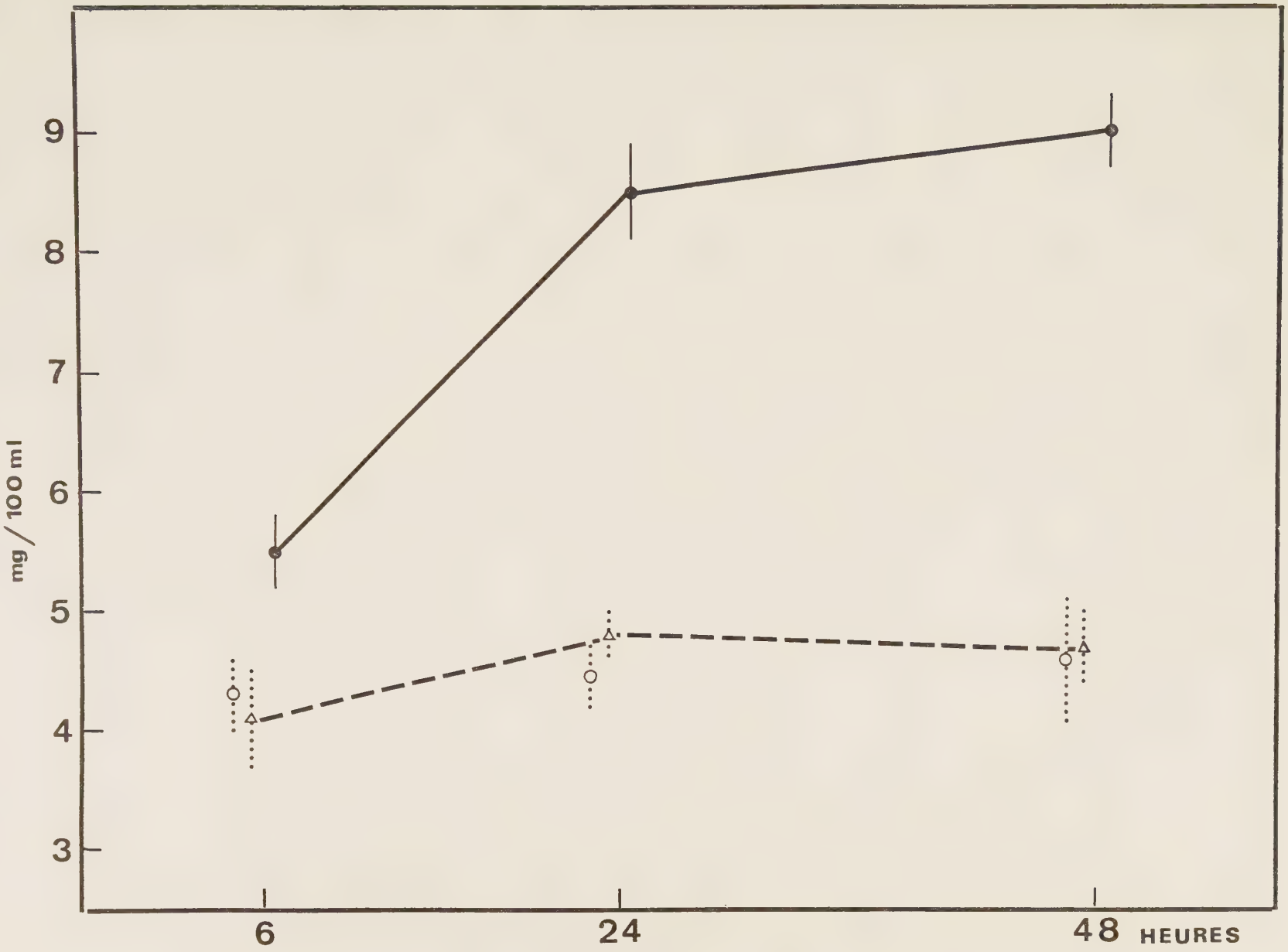

9
8
7
6
5
4
3
mg / 100 ml
6
24
48 HEURES

Figure 33.

Effets de l'injection de 10 unités U. S. P.

de P. T. H. sur la calcémie de Grenouilles à 4° C.




9
8
7
6
5
4
3
mg / 100 ml
6
24
48
HEURES

l'injection de 30 unités U. S. P., des variations individuelles de 4,7 mg/100 ml à 8 mg/100 ml. Ces modifications du taux du calcium plasmatique ne sont pas statistiquement significatives. Nous ne remarquons pas de modification des glandes calcarifères. Le taux du phosphore inorganique se maintient à 3,2 ± 1,0 mg/100 ml.

b) A la température de 4° C

Solution à 1 % de chlorure de calcium.

Toutes les Grenouilles meurent dans les 24 heures qui suivent l'injection soit d'une dose de 10 unités U. S. P., soit d'une dose de 30 unités U. S. P.

Solution à 0,5 % de chlorure de calcium.

Dans la 6e heure qui suit l'injection de 10 unités U. S. P.. on obtient une élévation du taux du calcium plasmique à 5,5 ± 0,3 mg/100 ml. Cette concentration continue son ascension (fig. 33). Au bout de 24 heures, elle atteint 8,5 ± 0,4 mg/100 ml et à la 48e heure, elle est de 9 ± 0,3 mg/100 ml.

Nous n'avons pas poursuivi plus avant nos expériences ; en effet, il est alors difficile de séparer ce qui est dû au froid de ce qui est dû à l'extrait parathyroïdien. Les glandes calcarifères sont nettement plus apparentes.

On obtient des résultats comparables avec une injection de 30 unités U. S. P. (fig. 34).

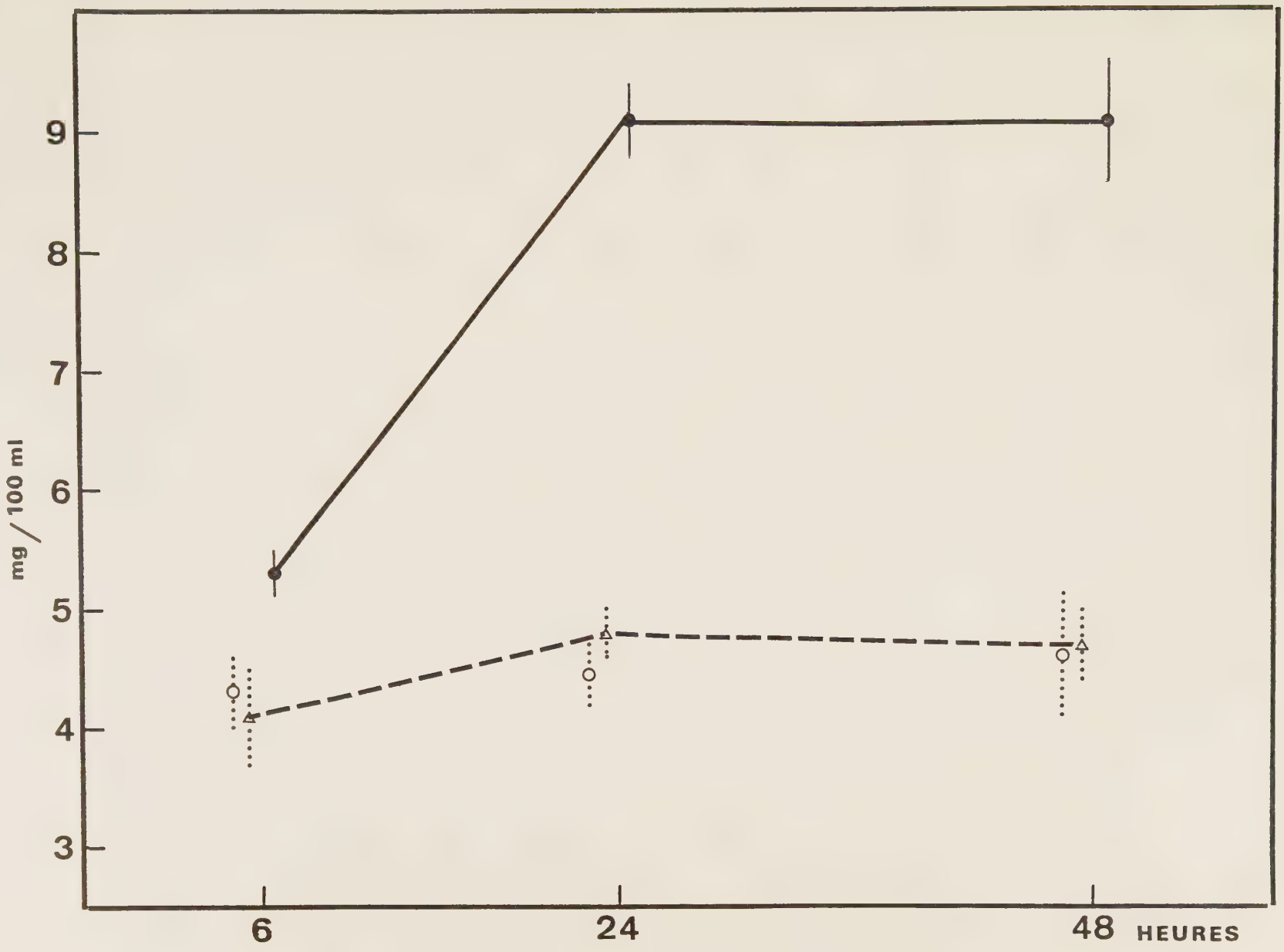
3) Discussion

Nos résultats peuvent être comparés à ceux de différents auteurs. Quoique les parathyroïdes ne semblent pas exister chez les

Figure 34.

Effets de l'injection de 30 unités U. S. P

de P. T. H. sur la calcémie de Grenouilles à 4° C.


9
8
7
6
5
4
3
mg / 100 ml
6
24
48
HEURES

Poissons, Fleming *et al* (1961) obtiennent, avec de faibles doses d'extraits parathyroïdiens chez *Fundulus kansae*, une montée du calcium plasmatique, seulement chez les femelles. Ils émettent l'hypothèse que l'hypercalcémie peut être induite en partie par les oestrogènes. Clark et Fleming (1963) ne peuvent confirmer ces résultats quand le Poisson est placé dans une eau privée de calcium.

Chez le Canard, Benoit (1950), l'injection d'extraits parathyroïdiens fait monter difficilement et faiblement la calcémie. Benoit pense que ces résultats sont dus à ce que les extraits utilisés proviennent de Mammifères. Or, selon la théorie de la spécificité zoologique de Houssay, les effets hétérozoïques sont souvent inférieurs aux effets homozoïques, en particulier lorsqu'il s'agit d'hormone protidique ou liée à des protides.

Chez la Tortue, Clark (1965) obtient, à des doses de 100 à 300 unités U. S. P., une hypercalcémie quoique la parathyroïdectomie soit sans effet. Par contre, elle reconnaît que l'on n'a pas pu démontrer, chez d'autres Reptiles, un effet significatif de la parathormone bovine sur le calcium sanguin. Ses résultats sont donc différents de ceux obtenus chez les Mammifères et ils suggèrent des différences de base entre les Mammifères et les Reptiles dans le métabolisme du calcium. Les extraits parathyroïdiens ne produisent pas de modification des phosphates plasmatiques.

Waggener (1930), chez *Rana catesbeiana* signale que l'extrait parathyroïdien produit une augmentation du calcium de 2 à 3 mg/100 ml.

Schrire (1941) pense que, chez *Xenopus laevis*, l'hormone parathyroïdienne produit une chute du phosphore sanguin suivie d'une augmentation.

Schlumberger *et al* (1953) montrent que les glandes calcarifères, chez *Rana pipiens*, servent de réservoir de calcium pour le maintien de l'homéostasie sanguine. Ils interprètent les différences qu'ils trouvent entre le genre *Xenopus* et le genre *Rana* dans le fait que les glandes calcarifères sont peu développées dans le genre *Xenopus*.

Pour Iwing *et al* (1955), 3 unités U. S. P. de parathormone Lilly n'affectent pas le taux du calcium sanguin de *Xenopus laevis* femelle.

Cortelyou (1962a) montre que 50 unités U. S. P. de Paroidin Parke Davis produisent des dommages aux reins. L'urine devient sanguinolente et verdâtre.

Pour Matty (1966), les hormones parathyroïdiennes d'origine mammalienne sont sans action chez les Batraciens.

Cortelyou (1967), chez *Rana pipiens*, trouve que 5 à 30 unités U. S. P. Paroidin Parke Davis conduisent à une augmentation de la concentration du calcium sanguin. Les résultats sont comparables à ceux observés chez les Mammifères après injection d'extraits parathyroïdiens. Les résultats contradictoires obtenus conduisent l'auteur à suggérer qu'il existe différents taux-seuil de sensibilité. Il montre que, à la température du laboratoire, la Paroidin produit une hypophosphatémie, mais il n'y a pas de changement de la phosphaturie. Par contre, les Grenouilles exposées au froid, présentent, après administration de l'hormone, une hyperphosphatémie.

Mc Whinnie *et al* (1967) montrent que des *Rana pipiens* stressées par le froid sont très sensibles à l'extrait parathyroïdien d'origine mammalienne. Les doses tolérées par les Grenouilles à la chaleur sont létales pour celles maintenues au froid. Il conclut, à la suite de von Brehm (1964) que la température pourrait être le facteur important des changements saisonniers.

F) INJECTION DE VITAMINE D_3

L'effet de l'injection de doses de vitamine D a été étudié, principalement, chez l'Homme, le Rat, le Cobaye, le Chien et le Poussin. Elle provoque une ostéolyse, libère ainsi le calcium de l'os et élève la calcémie.

1) Protocole expérimental

Les expériences sont réalisées en juin sur des lots de 6 Grenouilles, provenant de la "mare B", en bon état, ce qui permet de ne pas les nourrir, facilitant beaucoup les conditions expérimentales.

Les animaux sont placés dans des bocaux contenant des eaux de différentes qualités, sur une hauteur de 2 cm. Ils sont placés à la température ambiante. Ils reçoivent des injections de doses de 300.000 U. I., 150.000 U. I., 100.000 U. I. de vitamine D_3 cristallisée en solution aqueuse (Vi-$Dé_3$ Hydrosol Wander) dans le sac lymphatique dorsal.

Des témoins sont placés dans les mêmes conditions.

Des lots de 6 Grenouilles subissent des injections d'eau stérilisée et apyrogène.

Tous les animaux sont sacrifiés au bout de 12 jours.

2) Résultats

a) Eau provenant d'un échangeur d'ions

Les témoins (fig. 35) ont un taux de calcium plasmatique de 4,7 ± 0,2 mg/100 ml, ceux qui ont reçu une injection d'eau 4,3 ± 0,4mg/100ml.

L'injection de 300.000 U. I. montre que le taux de calcium se maintient à 4,6 ± 0,2 mg/100 ml quoique les glandes calcarifères soient un peu plus apparentes que chez les témoins (fig. 36). Après l'injection de 150.000 U. I., le taux du calcium plasmatique ne dépasse pas 4,7 ± 0,3 mg/100 ml. Après l'injection de 100.000 U.I., la concentration calcique est de 4,8 ± 0,4 mg/100 ml.

b) Solution de chlorure de calcium à 1 %

Les témoins utilisés sont les mêmes que lors de la manipulation précédente (fig. 35). Nous ajoutons en plus deux nouvelles séries de témoins qui sont placées dans une solution de $CaCl_2$ à 1 %. L'une qui ne reçoit pas d'injection d'eau stérilisée et apyrogène présente un taux de calcium plasmatique de 6,7 ± 0,4 mg/100 ml. L'autre qui reçoit l'injection d'eau a un taux de 6,2 ± 0,5 mg/100 ml.

Après une injection de 300.000 U. I., toutes les Grenouilles meurent. Les glandes calcarifères, dont nous allons rappeler l'origine, sont bien visibles. Chez les Anoures, l'oreille interne se développe énormément en arrière, donnant un énorme diverticule résultant de la fusion des deux canaux endolymphatiques, gauche et droit, le sac endolymphatique, qui s'étend dans le canal vertébral (Whiteside, 1922). Ce sac recouvre dorsalement une partie de l'encéphale et s'étend vers

l'arrière, au-dessus de la moelle épinière, dans le canal rachidien. Des portions de ce sac émergent au niveau des trous de conjugaison, entre les vertèbres, en enveloppant les ganglions rachidiens formant les glandes calcarifères. Elles se présentent comme des masses à contour irrégulier, blanchâtres en raison de microcristaux de carbonate de calcium qu'elles contiennent sous la forme aragonite (Funaoka *et al*, 1928). Par contre, chez les Mammifères, le calcium est stocké sous la forme de phosphate de calcium (Brandenberger *et al*, 1945). Les glandes calcarifères sont limitées par un épithélium cubique. Quand le sac est distendu, l'épithélium est très plat.

Schlumberger *et al* (1953), estiment que ces structures chez *Rana pipiens* servent de sites de stockage du calcium. Robertson (1970) ajoute que, au cours de l'hypocalcémie, le carbonate de calcium emmagasiné dans les glandes calcarifères diminue rapidement.

Après une injection de 300.000 U. I., nous voyons que les glandes calcarifères deviennent proéminentes sous la forme de corpuscules blanchâtres segmentés, paires, situés le long de la colonne vertébrale (fig. 37). Ceci suggère que les glandes calcarifères pourraient alors servir de réservoir pour un excès de calcium. La vessie contient une substance verdâtre, visqueuse, dont la présence a été déjà signalée par Cortelyou (1962a), lors de l'injection d'une dose de 50 unités U. S. P. d'extrait parathyroïdien.

Après l'injection de 150.000 U. I., l'aspect des glandes calcarifères est le même qu'après l'injection de 300.000 U. I., mais aucune Grenouille ne meure et l'on retrouve moins de concrétions

Fig. 35 - Glandes calcarifères - Grenouille témoin.

Fig. 36 - Glandes calcarifères -
Injection de 300.000 U. I. de vitamine D_3
Eau provenant d'un échangeur d'ions.

Fig. 37 - Glandes calcarifères -
Injection de 300.000 U. I. de vitamine D_3
Solution de chlorure de calcium à 1 %.

verdâtres dans la vessie. La concentration calcique s'élève à 16 ± 1 mg/100 ml.

L'injection de 100.000 U.I. montre des glandes calcarifères présentant les mêmes caractères, mais le taux du calcium plasmatique n'est plus que de 11 ± 0,6 mg/100 ml. Le taux du phosphore inorganique plasmatique se maintient à 3,1 ± 1,5 mg/100 ml.

3) Discussion

Schlumberger *et al* (1953) observent, chez *Rana pipiens*, que la vitamine D_3 n'amène pas de changement significatif des taux sériques du calcium et du phosphore. Mais la combinaison d'un traitement de vitamine D_3 et de chlorure de calcium conduit à une élévation significative du calcium sérique. Par contre, ils montrent que la vitamine D_3 seule, augmente le calcium sérique chez *Xenopus laevis* dont les glandes calcarifères sont peu développées. Le traitement n'a aucun effet sur la structure histologique des parathyroïdes. Ils notent seulement quelques modifications au niveau de l'os.

Pour Montsko *et al* (1963), l'administration de dihydrotachystérol et de chlorure de calcium, chez *Rana esculenta*, produit une élévation de la concentration du calcium sérique et urinaire. Au microscope photonique, ils ne trouvent pas de modifications histologiques. Ils notent seulement que, au microscope électronique, les parathyroïdes semblent apparaître en hypofonctionnement : ils trouvent peu de grains de sécrétion dans le cytoplasme, les mitochondries et l'ergastoplasme sont, en grande partie détruits, le noyau est granuleux.

Robertson (1968), chez *Rana pipiens*, trouve qu'une élévation du calcium sérique peut être obtenue par injection intramusculaire de vitamine D_2 en maintenant les animaux dans un bain de chlorure de

calcium à 0,8 %. L'absorption intestinale de calcium exogène est augmentée et se traduit par un dépôt de cristaux d'aragonite dans les glandes calcarifères.

En résumé, l'accumulation du calcium dans les glandes calcarifères, ôte de la circulation le calcium, en excès qui ne peut pas être rejeté rapidement dans les fèces et dans l'urine. La vitamine D_3 seule, ne peut faire varier le taux plasmatique du calcium qui se dépose au fur et à mesure dans les glandes calcarifères. Mais lorsque l'animal se trouve dans une solution de chlorure de calcium, le taux plasmatique croît. Le rôle de ces glandes calcarifères serait de maintenir constant le taux de calcium plasmatique en dépit de l'action de la vitamine D_3. D'ailleurs, chez *Xenopus laevis*, chez lequel il n'existe pas de glande calcarifère, la vitamine D_3 fait augmenter la concentration de calcium sérique à partir de celui libéré par l'os, même si l'animal se trouve dans une eau privée de calcium (Schlumberger *et al*, 1953). Il semble que la vitamine D_3 apporte le calcium dans le sang circulant. Ce calcium est sélectivement et rapidement prélevé par les glandes calcarifères quand la concentration du calcium sérique s'élève.

G) INJECTION DU SEL DISODIQUE DE L'ACIDE ETHYLENE - DIAMINO -TETRA - ACETIQUE

N'ayant pu mettre en évidence de signe de tétanie par parathyroïdectomie, nous recherchons si une hypocalcémie expérimentale

ne pourrait être induite par l'injection du sel disodique de l'acide éthylène - diamino - tétra - acétique (E. D. T. A.). C'est un agent chélateur de synthèse qui possède la propriété de se combiner avec des ions positifs tels que le calcium en formant des complexes solubles.

1) Protocole expérimental

Nos expériences sont effectuées en février-mars. Distribuées en lots de 6, les Grenouilles d'environ 60 g, élevées dans l'une des deux mares, reçoivent une injection d'une solution à 5 % d'E. D. T. A. dans le sac lymphatique dorsal.

Les animaux se trouvent dans des bocaux contenant, sur une hauteur de 2 cm, de l'eau provenant d'un échangeur d'ions. Ils sont à jeun depuis 48 heures.

2) Résultats

a) Injection de 5 ml de solution d'E. D. T. A.

On obtient aisément des signes de tétanie d'intensité variable en quelques minutes. On peut observer des contractions sporadiques spécialement aux extrémités. L'animal meurt en une demi-heure. Cette injection d'E. D. T. A. abaisse le taux de calcium ionique à un point tel que les échantillons de sang ne coagulent plus.

b) Injection de 2,5 ml de solution d'E. D. T. A.

Les mêmes symptômes se produisent. Ils sont plus importants du côté de la piqûre. L'animal meurt en une demi-heure.

c) Injection de 1 ml de solution d'E. D. T. A.

Une tétanie d'intensité variable, se développe dans les cinq premières minutes du côté de la piqûre. Au bout de 10 minutes, il y a contraction des extrémités et des gros muscles. Puis, ces contractions

Fig. A - Posture d'une Grenouille 10 minutes après une injection de 1ml de solution d'E. D. T. A.

Fig. B - Posture d'une Grenouille 40 minutes après une injection de 1ml de solution d'E. D. T. A.

se généralisent à tout l'individu. Les Grenouilles ont du mal à respirer. A la 40e minute, sans motif apparent, l'animal roule fréquemment sur le dos et se maintient dans cette position pendant plusieurs minutes. Les pattes postérieures sont tétanisées. La Grenouille repose le plus souvent sur son ventre. Les yeux et les poumons sont protubérants. Le plancher de la bouche s'élève et s'abaisse rapidement, compensant le manque de respiration pulmonaire. L'animal meurt vers la 70e minute.

Chez deux Grenouilles du lot, nous injectons 1 ml d'une solution à 10 % de gluconate de calcium à la 20e minute. Les tremblements disparaissent et les Grenouilles ne meurent pas.

Nous devons également observer que le poids des individus intervient. Une dose de 0,5 ml produit les mêmes effets chez une Grenouille de 25 g qu'une dose de 1 ml chez une Grenouille de 60 g.

d) Injection de 0,5 ml de solution d'E. D. T. A.

A la 10e minute, après l'injection, l'animal présente de petites difficultés respiratoires et quelques légères fibrillations au niveau des différentes parties du corps. Ces signes s'étendent, à la 40e minute, aux membres et à l'abdomen. Puis, ils diminuent rapidement et la Grenouille reprend son aspect normal. Il y a donc remontée du calcium sérique. Les mesures effectuées par Montsko *et al* (1963), par dosage par complexométrie, avec comme indicateur coloré le noir d'ériochrome (Glaz, 1958), confirment ce résultat. A la suite de l'injection de 20 mg d'E. D. T. A., ils observent une diminution du calcium sérique dans la première demi-heure suivant l'injection. Puis le taux remonte et redevient presque normal à la 6e heure. Nous-mêmes, nous avons obtenu, par photométrie de flamme, des résultats qui apparemment

s'opposent mais, en fait, complètent les précédents. Par photométrie de flamme (fig. 38), nous voyons que le taux de calcium, au lieu de diminuer, s'élève pendant la première heure pour atteindre 15,3 mg/100 ml. Puis il diminue. Mais nous dosons par photométrie de flamme le calcium non complexé et le calcium lié, c'est-à-dire le calcium total. Dans cette épreuve le calcium, au pH physiologique, est seulement partiellement dissimulé par chélation avec l'E. D. T. A. Il est vraisemblable que ce calcium lié est physiologiquement inactif, et que la réduction du calcium actif est susceptible de stimuler la libération du calcium en quantité importante dans la circulation sanguine. Mais cette libération peut devenir insuffisante comme le prouvent les résultats suivants :

e) Injection de 0,5 ml de solution d'E. D. T. A. toutes les 90 minutes

On obtient au cours de la première heure les signes que nous avons décrits précédemment. Après la deuxième injection, ces mêmes signes se renouvellent. Après la troisième injection, les symptômes obtenus sont les mêmes que ceux qui apparaissent après une injection de 5 ml et l'animal meurt au cours de la première demi-heure qui suit cette 3e injection.

f) Grenouilles parathyroïdectomisées

L'injection de 1 ml de solution d'E. D. T. A. chez les Grenouilles parathyroïdectomisées produit les mêmes effets que chez des Grenouilles normales.

3) Discussion

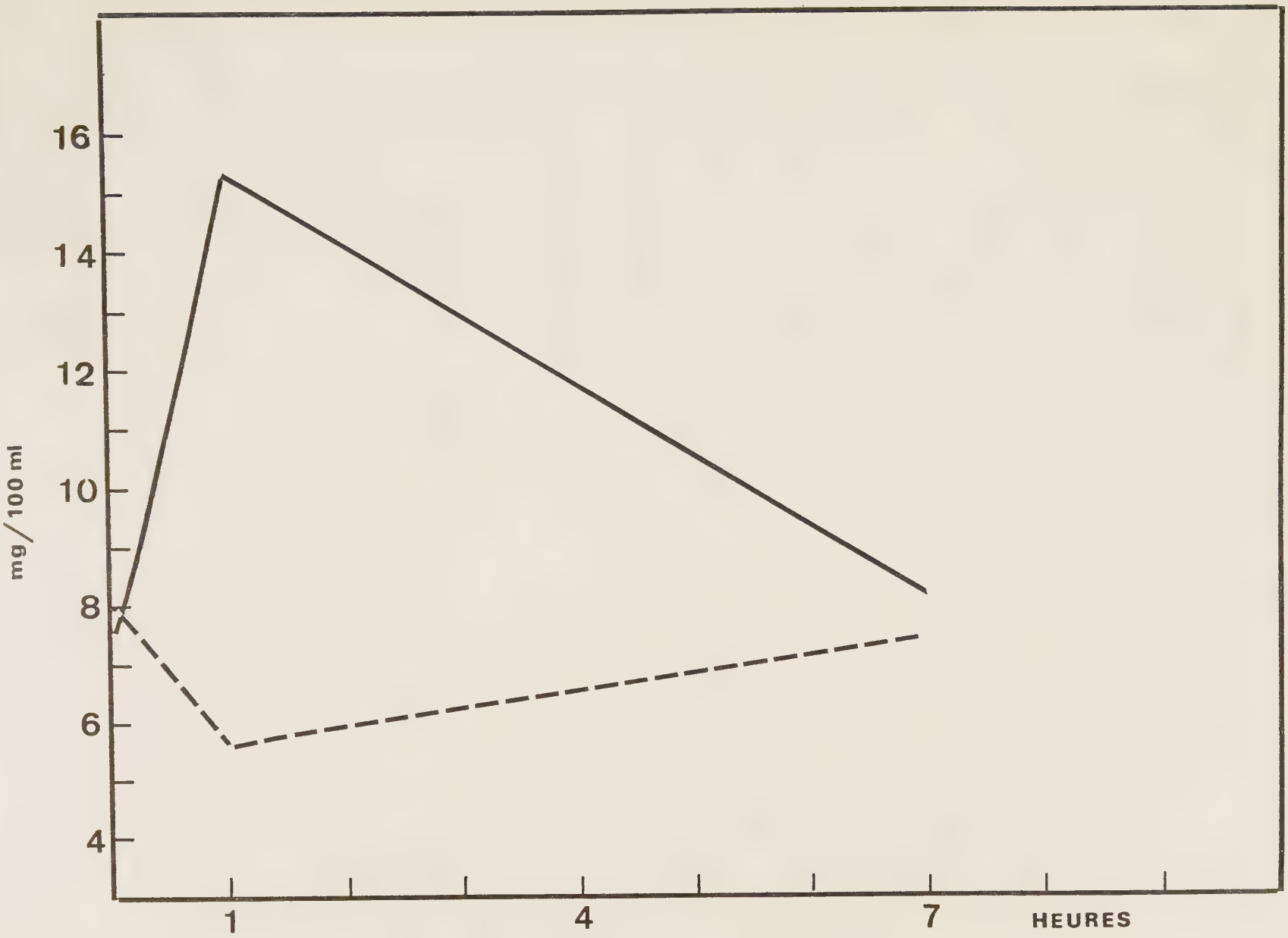
Montsko *et al* (1963) pensent que l'injection d'E. D. T. A.

Figure 38.

Variations de la calcémie chez la Grenouille
à la suite d'une injection d'E. D. T. A.

———— Dosage par photométrie de flamme

— — — — Dosage par complexométrie


16
14
12
10
8
6
4
mg/100 ml
1
4
7
HEURES

à des *Rana esculenta* diminue le calcium sérique. Ils relèvent que les parathyroïdes des Grenouilles traitées à l'E. D. T. A. ont un appareil de Golgi plus développé, des mitochondries plus osmiophiles, quelques gros grains de sécrétion sombres. Ils interprètent ces résultats en disant que les parathyroïdes ont été activées. Toutefois, l'E. D. T. A. ne provoque pas une hypocalcémie vraie, mais une augmentation de la fraction chélatée au détriment de la fraction ionisée.

En résumé, le sel disodique de l'acide éthylène diamino - tétra - acétique forme avec l'ion calcium un complexe soluble. L'ion calcium se trouve caché. Pour rétablir l'équilibre calcique, les glandes calcarifères libèrent du calcium dans l'organisme. Si la quantité d'E. D. T. A. injectée est relativement faible, ce calcium libéré est suffisant et la tétanie ne se produit pas. Le même résultat est obtenu en injectant du gluconate de calcium.

H) ACTION DES OESTROGENES

1) Protocole expérimental

Un lot de 6 Grenouilles femelles reçoit en mars, en injection intra péritonéale, une dose de 1/10 de mg de benzoate d'oestradiol (soit 1 000 U. I.), en solution dans 1/10 de ml d'huile d'olive neutre.

Un second lot de 6 Grenouilles femelles reçoit 1/10 de ml d'huile d'olive neutre en injection intrapéritonéale.

Un troisième lot de 6 Grenouilles femelles subit une injection d'hypophyses de Grenouille.

Un quatrième lot de 6 Grenouilles femelles sert de témoins.

Tous ces lots sont placés, à la température du laboratoire, dans des bocaux contenant de l'eau provenant d'un échangeur d'ions sur une hauteur de 2 cm. Les Grenouilles ne sont pas nourries. Les dosages sont effectués 3 jours après l'injection.

2) Résultats

Les témoins ont un taux de phosphore inorganique plasmique de 3,1 ± 0,8 mg/100 ml et une calcémie de 6,5 ± 0,4 mg/100 ml. Les Grenouilles qui reçoivent une injection d'huile d'olive neutre voient leur calcémie atteindre 9,8 ± 1 mg/100 ml, phénomène déjà connu chez l'Homme. Par contre, la phosphorémie n'est que de 3,5 ± 1,1 mg/100 ml.

L'injection de benzoate d'oestradiol élève la calcémie à 10 ± 1 mg/100 ml et la phosphorémie à 6,4 ± 1,6 mg/100 ml.

Les Grenouilles qui reçoivent une injection d'hypophyses ne présentent pas de variation de leur calcémie ou de leur phosphorémie par rapport aux témoins qui ont reçu une injection d'huile d'olive neutre.

3) Discussion

Aucun travail n'a été effectué à notre connaissance, chez les Batraciens.

Le benzoate d'oestradiol entraîne une forte augmentation de la calcémie en deux jours chez les Oiseaux (Benoit, 1950, Benoit *et al*, 1971).

Chez le Poisson rouge, Bailey (1957) rapporte qu'une augmentation du calcium du sang suit l'administration d'oestrogènes. Le phosphore sérique est également augmenté par ce traitement.

En résumé, on peut penser que le taux d'oestrogène ne semble pas, comme chez certains Mammifères et le Poisson rouge, influencer le taux de calcium. Ce taux n'augmente pas au cours de la ponte. L'augmentation que nous constatons, après l'injection de benzoate d'oestradiol, se produit également lorsque nous injectons son solvant.

Ces résultats sont donc différents de ceux mis en évidence chez les Mammifères chez lesquels, à l'aide d'éléments marqués, on a pu montrer que la libération du calcium osseux semblait aller de pair avec la libération d'une quantité équivalente de phosphore (Talmage *et al*, 1960).

I) CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

De ces résultats, il est possible de conclure que les parathyroïdes ne jouent pas un rôle important dans la physiologie de *Rana esculenta*. Cependant, ces glandes qui sont d'une importance vitale chez les Mammifères, ne sont certainement pas sans fonction. Chez les Mammifères, leur rôle principal est de maintenir constant le taux de calcium sanguin. Chez eux, la parathyroïdectomie conduit à une diminution du calcium sérique, conduisant à la tétanie et souvent à la mort.

Les ancêtres des Amphibiens, les Poissons, n'ont pas de parathyroïdes. On peut penser que la régulation de la calcémie dans ce groupe est due à un facteur exogène, la vitamine D, qui s'accumule en grande quantité dans le foie, spécialement chez les Téléostéens. Devenant terrestres, le poids de leur corps augmentant, un solide squelette

se développe, riche en calcium. La calcification du squelette, chez les Amphibiens, semble être encore sous l'influence de la vitamine D. Cependant, chez certains Amphibiens, la parathormone intervient plus ou moins nettement : elle contrôle alors le métabolisme du calcium de l'organisme, mobilisant le calcium du squelette lorsque c'est nécessaire, notamment lorsque ces Amphibiens ne possèdent pas de glandes calcarifères. Les résultats obtenus semblent prouver que les parathyroïdes de certains Batraciens jouent un rôle dans le métabolisme calcique, mais ces glandes ne sont pas essentielles à la vie des Amphibiens en général, parce que le mécanisme fournissant le calcium dans le sang est, au moins en partie, indépendant de l'hormone. Le rôle prédominant appartiendrait à la vitamine D. L'évolution du métabolisme calcique, chez les Vertébrés, montre une augmentation progressive du rôle joué par la parathormone. Chez *Rana esculenta*, en l'absence des parathyroïdes, et dans les conditions expérimentales, le taux du calcium et celui du phosphore inorganique du plasma ne sont pas modifiés. Après traitement par le chlorure de calcium ou la vitamine D_3, il n'y a pas de changements importants, mais la vitamine D_3 associée au chlorure de calcium provoque une hypercalcémie significative et les glandes calcarifères deviennent plus grosses. On peut donc penser que ces dernières peuvent servir à retenir un excès de calcium, maintenant le calcium à un taux presque constant.

Il est possible que la grande quantité de calcium qui se trouve dans les glandes calcarifères, permette un échange entre elles et le sang, qui soit suffisant pour maintenir le taux plasmatique de

cet ion. Finalement, les variations du calcium chez *Rana esculenta* sont probablement très lentes dans la nature, si bien que des fluctuations rapides ne peuvent se produire, même en l'absence de facteurs régulateurs.

On pourrait également penser que *Rana esculenta* maintient son taux de calcium en buvant mais, d'après Heller (1965), les Grenouilles ne boivent pas. Cependant, Schlumberger *et al* (1953) pensent avoir montré que l'on retrouve dans l'intestin le calcium marqué avalé par la Grenouille. Uranga *et al* (1958) ajoutent que des Grenouilles immergées dans une solution hypertonique boivent car le poids de l'animal augmente. Toutefois, nous avons observé que les variations sont sensiblement les mêmes au cours de l'année dans la nature, que l'eau soit riche ou pauvre en calcium.

D'autres possibilités d'absorption du calcium sont peu probables. La peau des Grenouilles serait relativement imperméable à l'ion calcium *in vivo* (Cooperstein *et al*, 1958, JØRGENSEN *et al*, 1963). Pour Huf *et al* (1951), le calcium et le magnésium sont des ions passifs qui restent à l'extérieur tandis que les ions sodium et chlorure peuvent traverser l'épithélium de la peau. Pour eux, le maintien des Grenouilles dans 2 à 3 cm d'eau leur permet d'absorber, par voie orale, les sels de calcium du milieu ambiant. Par contre, Hevesy *et al* (1935) pensent que la peau est perméable au calcium dans les deux directions de façon semblable, lorsque l'animal se trouve dans l'eau ou sur une surface humide.

La régulation du phosphore chez les Poissons, relève d'un mécanisme rénal et ces animaux prélèvent sur leur réserve osseuse en

cas de besoin.

Chez les Mammifères, la parathormone est impliquée dans la régulation de l'ion phosphate, mais par un mécanisme vraisemblablement induit et complexe. Il y a augmentation du phosphore du sérum lorsque l'animal est parathyroïdectomisé. Ce phénomène est accompagné d'une diminution du calcium sérique. Mais chez les Batraciens, le phosphore est-il "le fils adoptif" (Goldsmith, 1970) du calcium ?

Comme nous l'avons déjà signalé, nous n'avons pas remarqué de variation du phosphore plasmatique au cours de l'année.

Le froid ou la vitamine D_3 n'apportent pas de modification. Un taux élevé d'extrait parathyroïdien ne cause pas d'hypophosphorémie.

Par contre, l'administration d'oestrogènes semble influencer la phosphorémie.

Les variations individuelles, plutôt importantes qui se produisent dans le calcium et le phosphore inorganique plasmatique, quoique les animaux semblent en très bonne condition physique, peuvent suggérer qu'il y a un manque de régulation précise dans le taux plasmatique de ces ions. Cette opinion a déjà été émise par Zhenevskaya (1948).

D'autres glandes endocrines et d'autres hormones ont été impliquées dans la régulation du calcium et du phosphore chez les Poïkilothermes. Chez *Xenopus*, l'injection d'insuline produit une diminution du phosphore sanguin de 30 % tandis que l'injection d'adrénaline l'augmente de 24 % en 12 heures. L'hypophysectomie ou la castration abaisse le taux de calcium sérique de 25 %. Des extraits d'antéhypophyses amènent une augmentation du calcium de 20 % et une augmentation temporaire du phosphore de 10 %, suivie par une chute de 13 %

au-dessous du taux initial. La concentration en phosphore inorganique sérique retourne à la normale après 50 heures (Schrire, 1939a, b).

Finalement, l'étude de la physiologie des parathyroïdes chez les Batraciens révèle des différences avec celle des Mammifères et peut aider à élucider l'évolution de la fonction des parathyroïdes chez les Vertébrés.

C H A P I T R E I V

-=-=-=-=-=-

VARIATIONS DU VOLUME ERYTHROCYTAIRE DU SANG

Les éléments figurés du sang chez les Batraciens sont encore assez peu connus pour ce qui a trait aux variations dans le sang circulant au cours du cycle annuel. A l'occasion de l'étude de l'influence des parathyroïdes sur le calcium sanguin, nous avons mis en évidence des modifications saisonnières assez importantes au niveau du volume

érythrocytaire. Nous nous sommes donc intéressé à cette question et nous avons effectué une série d'expériences et de mesures s'y rapportant.

A) VARIATIONS ANNUELLES DU VOLUME ERYTHROCYTAIRE

1) Protocole expérimental

La première partie de nos expériences est effectuée sur des animaux élevés dans les mares. Le sang a été prélevé selon la technique décrite précédemment.

Les Grenouilles mâles utilisées ont un poids de 50 ± 5 g, les Grenouilles femelles pèsent 55 ± 5 g. Les prélèvements ont toujours été effectués au même moment de la journée. Les animaux ont été sacrifiés à la fin de la manipulation afin de vérifier, chez les femelles, l'état des organes.

2) Résultats

Les volumes respectifs occupés par les globules rouges et le plasma dans un échantillon de sang varient peu chez le mâle au cours de l'année. L'hématocrite est légèrement plus élevé en hiver, mais cette variation n'est pas significative. Après les calculs statistiques nécessaires, on trouve, chez 28 mâles prélevés au cours de l'année, que le volume des globules rouges est de 43 ± 1,71 % toute l'année.

Par contre, chez les femelles, les valeurs hématocrites présentent au cours de l'année des modifications du pourcentage de 22 à 49 % (fig. 39).

Au début de l'été, les 24 femelles étudiées, aux ovaires très petits, montrent une concentration en érythrocytes faible de 25,7 ± 1,26 %.

Figure 39.

Variations annuelles du volume érythrocytaire

x : Grenouilles mâles.

● : Grenouilles femelles (ovaires non développés).

▲ : Grenouilles femelles (oeufs en formation).

0 : Grenouilles femelles (oeufs formés).

◉ : Grenouilles femelles (48 heures après la ponte).

Pendant l'été et l'automne, nous avons prélevé 26 femelles dont les ovaires commencent à se développer ; on trouve alors une concentration de 32,5 ± 1,66 % de globules rouges.

En hiver et au printemps, les ovaires sont devenus très volumineux avec des oeufs bien formés ; la valeur hématocrite mesurée chez 28 Grenouilles atteint alors 42 ± 1,93 %

La concentration en érythrocytes du sang de ces Grenouilles est donc très voisine de celle des mâles. Ces variations saisonnières semblent déterminées par le cycle reproductif qui masque peut-être l'influence du froid : 8 Grenouilles femelles prélevées après la ponte et mises à une température de 4° C montrent en effet une élévation de leur hématocrite au bout de 2 mois à 30 ± 1,34 %.

B) INFLUENCE DE LA PONTE PROVOQUEE SUR LE VOLUME ERYTHROCYTAIRE

Au cours de nos observations, nous avons pu suivre 5 Grenouilles au moment de la ponte. Les animaux, sacrifiés 48 heures après celle-ci, avaient un hématocrite de 25,8 ± 1,74 %. C'est donc une diminution importante. Nous avons voulu vérifier expérimentalement ce résultat.

1) Protocole expérimental

Des Grenouilles ont été prises dans leur milieu naturel au cours de leur hibernation de novembre à mars. Elles étaient matures. Nourries, elles ont été conservées au laboratoire à une température de 18° C environ dans des bocaux de 2 litres contenant de l'eau de mare sur une hauteur de 2 cm environ pendant la semaine qui précédait l'expérience.

Afin de provoquer la ponte, des hypophyses sont injectées selon la technique décrite au chapitre I.

Chaque Grenouille expérimentée est replacée dans son bocal. La ponte se produit dans les 60 heures qui suivent.

2) Résultats

36 Grenouilles femelles ont ainsi reçu une injection pendant la période s'échelonnant de novembre à mars. La recherche du volume érythrocytaire est effectuée sur le sang prélevé selon la technique décrite plus haut, 48 heures après la ponte.

Chez 29 des 36 femelles, les valeurs hématocrites, mesurées après la ponte, sont voisines de celles des femelles aux ovaires très petits, ayant pondu, et que l'on trouve dans la nature au début de l'été. La concentration en érythrocytes se situe à 27,6 ± 2,39 % (fig. 40).

Par contre, chez les 7 femelles restantes et n'ayant pas pondu malgré une injection d'hypophyses, le volume des globules rouges est resté à 41,71 ± 2,22 %.

Un lot de 18 Grenouilles femelles témoins présente un hématocrite de 41,44 ± 2,92 %. Nous avons retrouvé ce même hématocrite chez 12 femelles matures qui avaient reçu, soit une injection de thyroïdes, soit une injection de surrénales.

Des résultats identiques ont été obtenus à la suite d'injections d'hypophyses de *Bufo bufo* femelles, *Salamandra salamandra* femelles, tous animaux matures. Par contre, une injection soit de 5, soit de 10,

Figure 40.

Influence de la ponte provoquée sur le volume érythrocytaire

▲ : Grenouilles femelles 48 heures après la ponte provoquée expérimentalement.

■ : Grenouilles femelles n'ayant pas pondu malgré une injection d'hypophyses.

O : Grenouilles femelles témoins.

soit de 20 unités-souris [1] d'hormone gonadotrope, d'origine bovine, n'a pas provoqué la ponte et la chute de l'hématocrite n'a pas eu lieu.

10 Grenouilles matures, mais n'ayant pas pondu, ont subi une injection de 1,5 ml d'eau stérilisée et apyrogène mais sans hypophyses. Elles présentent, 6 jours après, une concentration de 40,80 ± 2,10 % de globules rouges, donc comparable aux témoins.

L'injection d'hypophyses à des Grenouilles prélevées en juillet dans les mares, aux ovaires immatures et à l'hématocrite faible, ne modifie pas la concentration en érythrocytes. Par contre, des Grenouilles prélevées à la même époque et placées à une température de 4° C, pendant un mois, le rythme nycthéméral étant respecté, ont un hématocrite de 40,98 ± 2,90 %.

Chez le mâle, l'injection d'hypophyses ne fait pas varier la concentration érythrocytaire.

Des femelles matures, prêtes à pondre, maintenues à 4° C avec un rythme nycthéméral normal jusqu'en octobre, conservent une concentration en globules rouges élevée de 41,20 ± 2,30 %.

---

(1) L'unité-souris correspond à la plus petite quantité de produit qui, administrée en 6 injections à dose égale, détermine, 100 à 120 heures après la première injection, chez la souris femelle impubère de 10 à 21 jours, pesant 6 à 9 g, une augmentation pondérale des ovaires de 50 à 100 % par rapport aux animaux témoins et la formation des corps jaunes chez 50 % des animaux.

Un lot de 18 Grenouilles femelles a été castré immédiatement après la ponte. L'hématocrite est remonté à 40,35 ± 1,95 % chez 8 d'entre elles au mois de mars suivant. Les autres animaux, sacrifiés à intervalles réguliers, en mai, juin, juillet, août, septembre, ont présenté le même hématocrite. Par contre, les animaux opérés à blanc, ont montré l'année suivante, la chute normale de l'hématocrite immédiatement après la ponte.

En résumé, le volume érythrocytaire semble donc constant chez le mâle toute l'année. Chez la femelle, au contraire, il subit une baisse brutale, immédiatement après la ponte. Le sang est pauvre en globules rouges. Puis, la concentration érythrocytaire remonte progressivement pour atteindre son maximum au début de l'hiver, époque où les ovaires sont très volumineux et où les ovules apparaissent d'un blanc jaunâtre avec un des pôles plus ou moins noir. Cette augmentation est vraisemblablement liée à une érythropoïèse intense au début de l'automne. Par contre, la chute brutale au moment de la ponte correspondrait à une hémodilution qui serait due à une rétention d'eau comme le pensent Dierickx et Vandesande (communication personnelle), cette rétention étant elle-même sous la dépendance de modifications de la neurosécrétion hypothalamique.

C H A P I T R E V

-=-=-=-=-=-

CONCLUSIONS GENERALES

Le comportement d'un organisme résulte de l'interaction des influences diruptives du monde extérieur avec l'ensemble de ses constituants. Ces influences sont dues à l'action de facteurs d'ordres divers (physiques, chimiques, cosmiques, etc.) qui ont été isolés et souvent bien étudiés. Certains sont périodiques et

correspondent, par exemple, à l'alternance des saisons : Straub *et al* (1961) ont mis en évidence des variations saisonnières de la sensibilité à certains produits médicamenteux chez *Rana esculenta*. Toutes ces modifications de l'environnement peuvent tendre à placer l'organisme dans des conditions, d'habitat notamment, inconfortables. Elles vont entraîner des changements plus ou moins importants de son milieu interne qui, évidemment, doivent rester dans les limites extrêmes dont le maintien devient un aspect important de sa survie. Si les limites sont dépassées, l'animal meurt.

L'étendue des variations possibles des caractéristiques de l'organisme, compatibles avec la survie, est très différente dans les divers groupes d'animaux et à l'intérieur d'un même groupe souvent très restreint. Ce sont les Homéothermes qui les présentent à un moindre degré. Dès 1878, Claude Bernard a attiré l'attention sur leur aptitude remarquable à maintenir leur milieu interne constant, ou tout au moins dans une relative stabilité. Les stimuli de l'environnement externe vont entraîner des réactions tendant vers une régulation, vers une homéostasie. Ces stimuli sont perçus par des récepteurs plus ou moins spécialisés et les informations reçues par eux donnent lieu à des processus de défense par l'intermédiaire du système nerveux et du système endocrinien.

Au contraire, chez les Poïkilothermes, les variations de l'environnement externe conduisent à des écarts d'une certaine amplitude. Nos recherches ont mis en évidence, chez la Grenouille verte, certaines de ces variations, mais elles ne peuvent se concevoir que dans

certaines limites physiologiques qui sont celles de l'adaptation liées elles-mêmes, comme nous l'avons vu, à celles de la tolérance de l'organisme.

Les effets sur les fonctions endocriniennes sont nombreux. Le froid produit une activation intense de la thyroïde dont le maximum est atteint rapidement, surtout si une période d'adaptation ne précède pas le séjour au froid. Il provoque également une augmentation des cellules thyréotropes.

Le rôle de l'éclairement sur la fonction thyroïdienne est également important. A l'obscurité, la thyroïde de *Rana esculenta* L. présente une alternance de périodes de plusieurs jours d'activité de faible amplitude et de repos qui se manifestent pendant les premiers jours de l'expérience, alternance qui n'existe pas chez les animaux soumis au rythme nycthéméral normal de l'éclairement. Au bout de 21 jours, apparaissent des phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie intéressant à la fois le parenchyme thyroïdien et le tissu interstitiel parafolliculaire, correspondant à un arrêt de la sécrétion de l'hypophyse (Florentin et Stutinsky, 1936 , Moshkow, 1971).

Une augmentation progressive du nombre de globules rouges se produit et culmine au milieu de l'hiver chez la Grenouille femelle. Cette même variation se retrouve pour le calcium. Les valeurs les plus fortes se trouvent lorsque les Grenouilles ont subi la période froide.

Mais ces variations peuvent conduire également, dans un deuxième temps, à un processus d'acclimation. C'est le cas du froid. L'activation thyroïdienne par le froid est suivie d'un retour de la

glande à l'état de repos qui apparaît dès le 21e jour, accompagné d'une nette diminution du nombre des cellules thyréotropes.

Certes, la difficulté de ces études n'échappe à personne. Cerner les facteurs d'ambiance, dont certains sont à la limite de nos possibilités d'investigation, est déjà difficile, mais les corréler au fonctionnement biologique est encore plus complexe. Il reste donc beaucoup à faire et à connaître.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS, A. E. (1933). The effects of hypophysectomy and anterior lobe administration on the skin and thyroid of *Triturus cristatus*. *J. exptl. Biol.*, *10*, 247-255.

ALAPHILIPPE, F., JALLAGEAS, M., DEPIN, J. C. & GARGOUÏL, Y. M. (1966). Problèmes posés par l'utilisation expérimentale et la conservation des Grenouilles. *In : Symposium International sur l'avenir des animaux de laboratoires, 161-167, Paris.*

ALDER, A. & HUBER, E. (1923). Untersuchungen über Blutzellen und Zellbidung bei Amphibien und Reptilien. *Folia Haematol.*, *29*, 1-22.

ALESCHIN, B. (1939). Réaction thyréotrope de la glande thyroïde. *Rev. franç. Endocr.*, *17*, 237-295.

APLINGTON, H. W. (1961). Thyroidectomy cells of *Necturus* hypophysis. *Am. Zool.*, *1*, 433.

APLINGTON, H. W. (1962). Cellular changes in the pituitary of *Necturus* following thyroidectomy. *Anat. Rec.*, *143*, 133-145.

ARON, C. & ASCH, L. (1960). Influence de l'obscurité totale sur les fluctuations du pouvoir thyréotrope préhypophysaire et de l'activité thyroïdienne chez le Rat. *C. R. Soc. Biol.*, *154*, 404-408.

ARVY, L. (1968). La thyroïde et le métabolisme calcique. *J. Physiol.*, *60*, 405-448.

ASHBY, K. R. (1969). The population ecology of a self maintaining colony of the common frog *(Rana temporaria)*. *J. Zool.*, *158*, 453-474.

AZZALI, G. (1967). Sulle modificazioni cicliche stagionali e sperimentali dell' epitelio follicolare della tiroide di animali ibernanti. *Ateneo parmense*, *38*, 5-41.

BAILEY, R. E. (1957). The effect of estradiol on serum calcium, phosphorus, and protein of Goldfish.
J. exptl. Zool., 136, 455-469.

BARILLOT, J. C., ALAPHILIPPE, F., GARCOUÏL, Y. M. (1964). Influence de la température et de la durée de conservation sur quelques caractéristiques physiologiques de *Rana esculenta*.
C. R. Soc. Biol., 158, 2445-2448.

BECHT, G. (1969). Seasonal changes in the contents of inorganic ions in the blood of *Rana esculenta*.
Netherl. J. Zool., 19, 610-620.

BELANGER, L. F. & DROUIN, P. (1966). Osteolysis in the Frog. The effects of parathormone.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 44, 919-922.

BENOIT, J. (1950). Les glandes endocrines.
In : Traité de Zoologie (P. P. GRASSE ed.), 15, 290-334, Masson, Paris.

BENOIT, J. & CLAVERT, J. (1971). Action de la folliculine sur le métabolisme du calcium et l'ostéogénèse chez les Oiseaux.
In : Les hormones et le calcium (KLOTZ, H. P., ed.), 313-320, Expansion Scientifique Française, Paris.

BENOIT, J. & DA LAGE, C. (1963). Cytologie de l'adénohypophyse.
435 pp., C. N. R. S., Paris.

BERNARD, C. (1878). Leçons sur les phénomènes de la vie commune aux animaux et aux végétaux. Paris.

BERTHAUX, P. (1963). Exploration de la fonction parathyroïdienne.
In : Les Parathyroïdes (SOULAIRAC ed.), 543-572, Masson, Paris.

BEUTNER, E. H. & MUNSON, P. L. (1960). Time course of urinary excretion of inorganic phosphate by Rats after parathyroidectomy and after injection of parathyroid extract.
Endocrinol., 66, 610-616.

BLANQUET, P., MEYNIEL, G., CROIZET, M. & MOURA, A. M. (1968). Hypothalamus et thyroïde.
133-174, CAUTHIER - VILLARS, Paris.

BOSCHWITZ, D. (1961). The parathyroid glands of *Bufo viridis* Laurenti.
Herpetologica, 17, 192-199.

BOSCHWITZ, D. (1965). Histological changes in the parathyroids of *Bufo viridis* Laurenti.
Isr. J. Zool., 14, 11-23.

BOSCHWITZ, D. (1967). On the problem of seasonal changes in anuran parathyroids : observations on *Bufo viridis* in Israel.
Isr. J. Zool., 16, 46-48.

BRANDENBERGER, E. & SCHINZ, H. R. (1945). Uber die Natur der Verkalkungen bei Mensch und Tier und das Verhalten der anorganischen Knochensubstanz im Falle der hauptsächlichen menschlichen Knochenkrankheiten.
Helvet. med. Acta, 12, 1-63.

BRATTSTROM, B. H. (1963). A preliminary review of the thermal requirements of Amphibians.
Ecology, 44, 238-255.

BRATTSTROM, B. H. (1968). Thermal acclimatation in Anuran Amphibians as a function of latitude and altitude.
Comp. Biochem. Physiol., 24, 93-111.

BREHM, H. v. (1963). Morphologische Untersuchungen an Epithelkörperchen *(glandulae parathyreoideae)* von Anuren - I.
Z. Zellforsch., 61, 376-400.

BREHM, H. v. (1964). Experimentelle Studie zur Frage der jahreszyklischen Veränderungen Morphologische Untersuchungen an Epithelkörperchen *(glandulae parathyreoideae)* von Anuren - II.
Z. Zellforsch., 61, 725-741.

BRIEN, P. (1941). Guide des Travaux Pratiques de Zoologie.
29-86, Desoer, Liège.

CARDELL, R. R. (1962). The origin of the thyroidectomy cell in the Salamander.
5th. Internat. congr. Electron. Microsc., Philadelphia, Acad. Press, London.

CARDELL, R. R.(1964). Ultrastructure of the Salamander thyroidectomy cell.
J. Ultrastruct. Res., 10, 515-527.

CEHOVIC, G. (1957). L'effet de l'obscurité continue sur la fixation de ^{131}I dans la thyroïde des Grenouilles *(Rana esculenta* et *Rana temporaria).*
C. R. Acad. Sci., 244, 2647-2650.

CHARLES, E. (1931). Metabolic changes associated with pigmentary effector activity and pituitary removal in *Xenopus laevis* II. Calcium and magnesium content of the serum.
Proc. Roy. Soc., 107, 504-510.

CHARRIPER, A. A. (1929). Studies on amphibian endocrines. The thyroid gland of *Necturus maculosus.*
Anat. Rec., 44, 117-141.

CHARRIPER, A. A. (1931). Studies on amphibian endocrines. The pituitary gland of *Necturus maculosus.*
Anat. Rec., 49, 345-358.

CHATARD, D. (1960). Elevage de Crapauds et Grenouilles adultes.
Bull. Union des Naturalistes, 47, 69-72.

CHUGUNOV, J. U. D. (1966). En russe (Le rythme polyphasique de l'activité nycthémérale de *Rana temporaria*).
Zool. Zh., 45, 1692-1697.

CLARK, N. B. (1965). Experimental and histological studies of the parathyroid glands of fresh water Turtles.
Gen. Comp. Endocrinol., 5, 297-312.

CLARK, N. B. & FLEMING, W. R. (1963). The effect of mammalian parathyroid hormone on bone histology and serum calcium levels in *Fundulus kansae.*
Gen. Comp. Endocrinol., 3, 461-467.

CLARK, N. B., PANG, P. K. T. & DIX, M. W. (1969). Parathyroid glands and calcium and phosphate regulation in the Lizard, *Anolis carolinensis.*
Gen. Comp. Endocrinol., 12, 614-618.

CLEVELAND, R. & WOLFE, Z. M. (1932). A differential stain for the anterior lobe of the hypophysis.
Anat. Rec., 51, 409-413.

COLE, E. J. (1961). Micro and wintrobe hematocrit determination upon bovine blood.
Veter. Med., 56, 176-177.

COLEMAN, R. (1969). Ultrastructural observations on the parathyroid glands of *Xenopus laevis* Daudin.
Z. Zellforsch., 100, 201-214.

CONKLIN, R. E. (1930). The formation and circulation of lymph in the Frog. II. Blood volume and pressure.
Amer. J. Physiol., 95, 91-97.

COOPERSTEIN, I. L. & HOGBEN, C. A. M. (1958). Ionic transfers across the isolated Frog large intestine.
J. Gen. Physiol., 42, 461-474.

COPP, D. H., COCKCROFT, D. W., KUEH, Y. & MELVILLE, M. (1968). Calcitonin-ultimobranchial hormone.
In : Calcitonin (TAYLOR, S. ed.). Proceedings of the Symposium on Thyrocalcitonin and the C cells, 306-321, Heinemann Medical Books, London.

CORDIER, R. (1953a). Cytologie hypophysaire et sa signification fonctionnelle chez l'Amphibien *Xenopus*.
C. R. Assoc. Anat., 484-490.

CORDIER, R. (1953b). L'hypophyse de *Xenopus*. Interprétation histophysiologique.
Ann. Soc. Roy. Zool. Belg., 84, 5-16.

CORDIER, R. & HERLANT, M. (1957). Etudes histochimiques sur les cellules du lobe antérieur de l'hypophyse chez *Xenopus laevis*.
Ann. Histochem., 4, 348-359.

CORTELYOU, J. R. (1958). Parathyroid glands in Amphibians.
Anat. Rec., 132, 424.

CORTELYOU, J. R. (1960a). Plasma and urine phosphorus changes in totaly parathyroidectomized *Rana pipiens*.
Anat. Rec., 137, 346-349.

CORTELYOU, J. R. (1960b). The effects of commercially prepared parathormone on calcium and phosphorus levels in unoperated *Rana pipiens*.
Anat. Rec., 138, 341-351.

CORTELYOU, J. R. (1962a). Changes in plasma and urine calcium and phosphorus of *Rana pipiens* subsequent to different dose levels of Paroidin.
Am. Zool., 2, 400.

CORTELYOU, J. R. (1962b). Phosphorus changes in totally parathyroidectomized *Rana pipiens*.
Endocrinol., 70, 618-621.

CORTELYOU, J. R. (1965). Parathormone influenced metabolism in Amphibia. *Excerpta Med. Intern. Congr. Ser.*, *99*, 50-51.

CORTELYOU, J. R. (1967). The effect of commercially prepared parathyroid extract on plasma and urine calcium levels in *Rana pipiens*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *9*, 234-240.

CORTELYOU, J. R., HARGIS, G. K. & LEHRER, L. (1962). Influence of mammalian parathormone on bone composition in the Frog, *Rana pipiens*. *Am. Zool.*, *2*, 400-401.

CORTELYOU, J. R., HIBNER-OWERKO, A. & MULROY, J. (1960). Blood and urine calcium changes in totally parathyroidectomized *Rana pipiens*. *Endocrinol.*, *66*, 441-450.

CORTELYOU, J. R. & Mc WHINNIE, D. J. (1967). Parathyroid glands of Amphibians. I. Parathyroid structure and function in the Amphibian, with emphasis on regulation of mineral ions in body fluids. *Am. Zool.*, *7*, 843-855.

CORTELYOU, J. R. QUIPSE, P. A. & Mc WHINNIE, D. J. (1967). Parathyroid extract effects on phosphorus metabolism in *Rana pipiens*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *9*, 76-92.

CZALPLICKI, J. (1958). The functional and structural changes of the hymain parathyroids depending on age. *Endokrynol. Polska*, *9*, 243-254.

DA LAGE, C. & RACADOT, J. (1963). Modifications expérimentales de la cytologie du lobe antérieur de l'hypophyse du Lapin en relation avec la fonction thyréotrope. *Bull. Micro. appl. (2)*, *13*, 149-153.

DEB, C. & BORAL, M. C. (1964). Body fluid and hematological changes in a poikilothermic animal on cold exposure. *Amer. J. Physiol.*, *207*, 865-867.

DEB, C. & HART, J. S. (1956). Haematological and body fluid adjustments during acclimatation to a cold environment. *Can. J. Biochem. Physiol.*, *34*, 959-966.

DELSOL, M. (1955). La sécrétion de thyroxine et d'hormone thyréotrope chez *Rana esculenta* L. au début de l'hiver. *C. R. Soc. Biol.*, *149*, 532-533.

DELSOL, M. (1960). Quelques répercussions endocriniennes du jeûne alimentaire prolongé chez *Rana esculenta* Phénomène de pseudo-hypophysectomie.
Proc. Soc. Linn. Bordeaux, 48, 111-120.

DELSOL, M. & FLATIN, J. (1956). Action de la température sur l'activité de l'hormone thyréotrope chez deux vertébrés inférieurs, *Rana esculenta* et *Carassius auratus*.
C. R. Soc Biol., 150, 938-940.

DELSOL, M. & VERNE, J. (1956). La sécrétion d'hormone thyréotrope dans l'hypophyse de *Rana esculenta* L. Variations annuelles et spécificité sexuelle de cette sécrétion.
C. R. Soc. Biol., 150, 132-134.

DENT, J. N. (1961). Cytological response of the newt pituitary gland to thyroidal depression.
Gen. Comp. Endocrinol., 1, 218-231.

DERN, R. (1953). Der Einfluss verschiedner Belichtungszeiten auf Hypophyse Schilddrüse und Larvenentwicklung von *Rana temporaria*.
Zool. Jahrb., 63, 477-481.

DEYRUP, I. J. (1964). Water balance and kidney.
In : Physiology of the Amphibia (MOORE, ed.), 251-328, *Academic Press, New-York*.

DIERICKX, K. (1964). The structure and activity of hypophysis of *Rana temporaria* in normal and experimental conditions.
Z. Zellforsch., 61, 920-939.

DODD, J. M. & DODD, M. H. I. (1968). Phylogenetic specificity to thyroid stimulating hormone with special reference to the Amphibia.
In : Specific Zool. Hormones hypophys. Activ., 277-286, *C. N. R. S. Paris*.

DOERR-SCHOTT, J. (1963). Etude de la cytologie fine des différents types de cellules de l'antéhypophyse chez la Grenouille rousse, *Rana temporaria* L.
Gen. Comp. Endocrinol., 3, 695-696.

DOERR-SCHOTT, J. (1965a). Hypophyse distale de *Xenopus laevis* D. Etude comparative aux microscopes optique et électronique.
C. R. Acad. Sc., 260, 283-286.

DOERR-SCHOTT, J. (1965b). L'hypophyse de Crapaud, *Bufo vulgaris* Laur. Etude comparative aux microscopes optique et électronique.
C. R. Acad. Sci., 260, 969-972.

DOERR-SCHOTT, J. (1965c). Etude comparative de la cytologie et de l'ultrastructure de l'hypophyse distale de trois espèces d'Amphibiens Anoures : *Rana temporaria* L., *Bufo vulgaris* Laur., *Xenopus laevis* D. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5, 631-653.

DOERR-SCHOTT, J. (1966). Modifications ultrastructurales des cellules thyréotropes de l'hypophyse distale de la Grenouille rousse après thyroïdectomie. *C. R. Acad. Sci.*, 262, série D, 1973-1976.

DOERR-SCHOTT, J. (1968). Cytologie et cytophysiologie de l'adénohypophyse des Amphibiens. *Ann. Biol.*, 7, 189-225.

DOERR-SCHOTT, J. (1971). Etude comparative des résultats cytologiques, histologiques, cyto-physiologiques et ultrastructuraux enregistrés par différents auteurs dans l'hypophyse antérieure des Amphibiens. *Ann. Endocrinol.*, 32, 371-379.

DONGEN, W. J. v., JØRGENSEN, C. B., LARSEN, L. O., ROSENKILDE, P., LOFTS, B., OORDT, P. G. W. J. v. (1966). Functions and cytology of the normal and autotransplanted *pars distalis* of the hypophysis in the Toad, *Bufo bufo* L. *Gen. Comp. Endocrimol.*, 6, 491-518.

DOWLING, J. T., RAZEVSKA, D. & GOODNER, C. J. (1964). Metabolism of thyroid hormones in Frogs and Toads. *Endocrinology*, 75, 157-166.

DUGUY, R. (1967). Le cycle annuel des éléments figurés du sang chez *Emys orbicularis* L., *Lacerta muralis* Laur. et *Natrix maura* L. *Bull. Soc. Zool.*, 92, 23-37.

DUGUY, R. (1970). Le sang des Reptiles. *In : Traité de Zoologie (P. P. GRASSE ed.)*, 14, 474-498, Masson, Paris.

ECKER, A. (1889). The anatomy of the Frog. *449 pp., Clarendon Press, Oxford.*

EDWARDS, W. (1824). De l'influence des agents physiques sur la vie. Paris.

EICKHOFF, W. (1963). Die Wirkung experimentalle Wechseltemperaturen auf die Schilddrüse des Frosches und des Tageslichtes auf die Schilddrüse der Kuh. *Arch. exper. veter. Med.*, 17, 229-240.

EULER, U. S. v. & HELLER, H. (1963). Comparative Endocrinology. *1, 543 pp., Academic Press, New-York.*

EWER, R. F. (1952). The effects of posterior pituitary extracts on water balance in *Bufo carens* and *Xenopus laevis* together with some general considerations of anuran water economy. *J. Endocrinol., 29, 429-439.*

FIGGE, F. H. & UHLENHUTH, E. (1933). The morphology and physiology of the Salamander thyroid gland. VIII. Further experiments on the thyreoactivator. *Physiol. Zool., 6, 430-465.*

FLEMING, W. R. & MEIER, A. (1961). The effect of mammalian parathormone on the serum calcium levels of *Fundulus kansae* and *Fundulus catenatus*. *Comp. Biochem. Physiol., 2, 1-7.*

FLORENTIN, P. (1937). La neurocrinie hypophysaire chez le Crapaud *(Bufo vulgaris* Laur). Etude expérimentale. *C. R. Soc. Biol., 126, 331.*

FLORENTIN, P. & STUTINSKY, F. (1936). Modifications cytologiques de la glande pituitaire des Grenouilles maintenues à l'obscurité. *C. R. Soc. Biol., 122, 674-676.*

FONTAINE, M. (1964). Corpuscules de Stannius et régulation ionique (Ca, K, Na) du milieu intérieur de l'Anguille (*Anguilla anguilla* L.). *C. R. Acad. Sci., 259, 875-878.*

FONTAINE, Y. A. (1968). La spécificité zoologique des protéines hypophysaires capables de stimuler la thyroïde. *Thèse Doct., 259 pp., Paris.*

FONTAINE, M. & FONTAINE, Y. A. (1957). Influence de l'origine zoologique des substances hypophysaires thyréotropes sur leur activité en fonction de la température. *J. Physiol., 49, 169-173.*

FONTAINE, M. & LACHIVER, F. (1955). Thyroïde et thermorégulation chimique. *Arch. Sci. Physiol., 9, C 63-C 81.*

FRY, H. K., ADELAIDE, M. B. & OXON, B. (1944). The blood volume cold-blooded animals as determined by experiments upon Frogs and Lizards. *Quart. J. exper. Physiol., 7, 185.*

FUNAOKA, S. & TOYOTA, S. (1928). Untersuchungen über die transmikroskopische Struktur des Lebewesenkörpers. Uber die chemische Natur und die Entstenung der Otolithen der *Rana esculenta*.
Folia Anat. Japon, 6, 323-325.

GABE, A. (1953). Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde.
Bull. Micro. appl., (2), 3, 153-162.

GABE, A. (1954). Données histologiques sur l'appareil digestif des Onychophores.
Bull. Soc. Zool., 79, 141-150.

GABE, A. (1968). Techniques histologiques.
1113 pp., Masson, Paris.

GABE, A. & MARTOJA-PIERSON, M. (1957). Sur une coloration trichrome en un temps sans différenciation.
Bull. Micro. appl., (2), 7, 60-63.

GLASS, F. M. & RUGH, R. (1944). Seasonal study of the normal and pituitary stimulated Frog *Rana pipiens*.
J. Morph., 74, 409-427.

GLAZ, E. (1958). A rapid and simple method for serum-Ca-determination.
Orvosi Hetilap., 99, 968

GOLDSMITH, R. S. (1970). Effets biologiques et mécanisme d'action du phosphate.
In : L'ion phosphate, biologie et physiopathologie. Triangle, 10, 1-7.

GORBMAN, A. (1959). Comparative Endocrinology.
746 pp., Wiley, New-York.

GREEP, R. O. (1963). Parathyroid glands.
In : Comparative Endocrinology. (U. S. v. EULER and H. HELLER, ed.), 1, 325-370, *Academic Press, New-York.*

GREEP, R. O. & TALMAGE, R. V. (1961). The parathyroids.
389 pp., Thomas, Springfield.

GROBSTEIN, G. (1938). Appearance of vacuolated cells in hypophysis of *Triturus torosus* following bilateral thyroidectomy.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 38, 801-803.

GUARDABASSI, A. (1960). The utilization of the calcareous deposits of the endolymphatic sacs of *Bufo bufo bufo* in the mineralization on the skeleton. Investigations by means of ^{45}Ca.
Z. Zellforsch., 51, 278-282.

GUARDABASSI, A. & BLANCHI, D. (1962). La cytologie hypophysaire chez *Xenopus laevis* Daud.
Z. Zellforsch., 56, 540-551.

GUARDABASSI, A. & LATTES, M. G. (1966). L'aziole dell'ormone paratiroideo sui segmenti scheletrici di *Bufo bufo in vivo* e *in vitro*.
Arch. Zool. ital., 51, 697-704.

HARA, J., ISONO, H. & FUJII, A. (1959). Electron microscopic observation of the parathyroid gland of the Toad, *Bufo vulgaris japonicus*.
Acta Sch. Med. Gifu, 7, 1548-1558.

HARA, J. & YAMADA, K. (1965). Chemocytological observations on the parathyroid gland of the Toad *(Bufo bufo japonicus)* in specimens taken throughout the year.
Z. Zellforsch., 65, 814-828.

HARRIS, G. W. & DONOVAN, B. T. (1966). The pituitary gland.
1, 586 pp., 2, 670 pp., Butterworths, London.

HEIDENHAIN, M. (1915). Färbungen.
Enzykl. Mikr. Technick., 1, 680 pp.

HELLER, H. (1965). Osmoregulation in Amphibia.
Arch. Anat. micr., 54, 471-490.

HERLANT, M. (1942). Déterminisme de la basophilie des cellules cyanophiles du lobe antérieur de l'hypophyse.
Bull. Acad. roy. Belg., cl. Sci., 28, 588-593.

HERLANT, M. (1949). Study of the pituitary body with the periodic acid Schiff reaction.
Nature, 164, 703-704.

HERLANT, M. (1956a). Corrélations hypophyso-génitales chez la femelle de la Chauve-Souris, *Myotis myotis* (Borkhausen).
Arch. Biol., 67, 89-180.

HERLANT, M. (1956b). Les cellules basophiles du lobe antérieur de l'hypophyse chez l'Homme.
Arch. Biol. (Liège), 67, 539-553.

HERLANT, M. (1960). Etude critique de deux techniques nouvelles destinées à mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire.
Bull. Micr. appl., (2), 10, 37-44.

HERLANT, M. (1962a). Cytochimie du lobe antérieur de l'hypophyse.
1er congrès europ. Anat., 562-596, Fischer, Iena.

HERLANT, M. (1962b). Quelques notions récentes sur l'histophysiologie de l'antéhypophyse.
Biol. Med., 51, 205-222.

HEVESY, G., HOFER, E. & KROGH, A. (1935). The permeability of the skin of Frogs to water as determined by D_2O and H_2O.
Skand. Arch. Physiol., 72, 199-214.

HIRSCHLEROWA, Z. (1928). Mikroskopisch-anatomische Untersuchungen an der Amphibienschilddrüse mit besonder Berücksichtigung ihres Golgi apparates.
Z. Zellforsch., 6, 234-256.

HOFFMAN, R. A. & ZARROW, M. X. (1958). A comparison of seasonal changes and the effect of cold on the thyroid gland of the male Rat and ground Squirrel *(Citellus tridecimlineatus).*
Acta Endocrinol., 27, 77-84.

HOLZAPFEL, R. A. (1937). The cyclic character of hibernation in Frogs.
Quart. Rev. Biol., 12, 1.

HOUSSAY, B. A., GUETI, L. & LASCANO-GONZALES, J. M. (1929). Implantation d'hypophyse et stimulation des glandes et des fonctions sexuelles du Crapaud.
C. R. Soc. Biol., 102, 864.

HOUSTON, A. H. & HUSBANDS, L. E. (1965). Some observations upon para-thyroprivic *Rana catesbeiana.*
Rev. Canad. Biol., 24, 163-168.

HSIEH, A. C. L. & CARLSON, L. D. (1958). Role of the thyroid in metabolic response to low temperature.
Amer. J. Physiol., 188, 40-49.

HUF, E. G. & WILLS, J. (1951). Influence of some inorganic cations on active salt and water uptake by isolated Frog skin.
Amer. J. Physiol., 167, 255-260.

HUXLEY, J. S. (1929). Thyroid and temperature in cold-blooded Vertebrates.
Nature, *123*, 712.

IRVING, J. T. & SOLMS, C. M. (1955). The influence of parathyroid hormone upon bone formation in *Xenopus laevis*.
S. African J. Med. Sci., *20*, 32.

ISONO, H. (1960). Histological studies of the parathyroid gland in the Toad *(Bufo vulgaris japonicus)*.
Acta Sch. Med. Gifu, *8*, 277-293.

ISONO, H., ISONO, S. & KOMURA, M. (1959). On the seasonal cyclic changes in the glycogen contents in the parathyroid gland of the Toad. *(Bufo vulgaris japonicus)*.
Acta Sch. Med. Gifu, *7*, 1696-1704.

ITURRIZA, F. C. (1964). An electron microscopic study of the Toad *(pars distalis)*.
Gen. Comp. Endocrinol., *4*, 225-232.

JANKOWSKY, H. O. (1960). Uber die hormonale Beeinflussung der Temperaturadaptation beim Grasfrog *(Rana temporaria* L.).
Zeitschr. Vergl. Physiol., *43*, 392-410.

JENKIN, P. M. (1962). Animal Hormones.
310 pp., Pergamon Press, London.

JIANG LING-GEN. (1966). Histochemical identification of thyrotrophin-cells in the adenolypophysis of the Toad *(Bufo bufo gargarizans)*.
Acta Zool. Sin., *18*, 153-160.

JOEL, T., D'ANGELO, S. A. & CHARIPPER, E. A. (1949). The effect of the thiourea on the thyroid gland of the winter Frog *(Rana pipiens)* with some observations on the testis.
J. Exp. Zool., *110*, 19-31.

JOLY, J. (1959). Données histologiques sur l'adénohypophyse de *Salamandra salamandra taeniata* Düringen.
C. R. Acad. Sci., *249*, 312-314.

JORDAN, H. E. (1925). The experimental production of osteoclasts in the Frog, *Rana pipiens*.
Anat. Rec., *30*, 107-121.

JØRGENSEN, C. B. & LARSEN, L. O. (1963). Neuroadenohypophysial relationships.
Symp. Zool. Soc., *9*, 59-82.

KAYSER, C. (1950). Les échanges respiratoires de la Grenouille *(Rana esculenta)* et du spermophile *(Citellus citellus)* entre 0° et 10° C. *C. R. Soc. Biol., 144, 1697-1699.*

KAYSER, C. (1953). L'hibernation des Mammifères. *Ann. Biol., 29, 108-150.*

KAYSER, C. (1961). The physiology of natural hibernation. *323 pp., Pergamon Press, London.*

KNIGGE, K. M., GOODMAN, R. S. & SOLOMON, D. H. (1957). The role of pituitary, adrenal and kidney in several thyroid responses of cold-exposed Hamsters. *Amer. J. Physiol., 189, 415-419.*

KUFFLER, S. W. (1945). Excitability changes at the neuromuscular junction during tetany. *J. Physiol., 103, 403-411.*

KURZWEG, G. & MASSMANN, W. (1962). *Röntgen und Laboratoriumspraxis, 2, 37, Springer, Berlin.*

LANGE, R. & BREHM, H. v. (1965). On the fine structure of the parathyroid gland in the Toad and the Frog. *In : The parathyroid gland, (P. J. CAILLARD, R. V. TALMAGE & A. M. BUDY, ed.), 19-26, University of Chicago Press.*

LEGAIT, H. (1966). Variations volumétriques des lobes hypophysaires de la Grenouille verte mâle placée dans différentes conditions expérimentales. *C. R. Soc. Biol., 160, 1046-1049.*

LELOUP, J. & FONTAINE, M. (1960). Iodine metabolisme in lower Vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci., 86, 316-353.*

LEYDIG, F. (1852). Uber die Thyroidea und Thymus einiger Bratrachier. Frorieps Tagesber. über d. Fortschr. in Natur und Heilkunde. *Abt. Zool. Paläontolo., 2, 236-238.*

LUNGU, A. (1966). Seasonal periodicity of endocrine functions. *Rev. Roum. Endocrinol., 3, 171-184.*

LYNN, W. G. & WACHOWSKI, H. E. (1951). The thyroid gland and its functions in cold blooded Vertebrates. *Quart. Rev. Biol., 26, 123-168.*

MacINTYRE, I. (1961). Flame photometry.
Adv. Clin. Chem., *4*, 1-27.

MAHER, M. J. (1967). Response to thyroxine as a function of environmental temperature in the Toad *Bufo woodhousii* and the Frog *Rana pipiens*.
Copeia, *2*, 361-365.

MARX, C., METZ, B. & KAYSER, C. (1946). Le rythme nycthéméral de la température et de l'activité chez la Grenouille *(Rana esculenta* et *Rana temporaria)*.
C. R. Soc. Biol., *140*, 609-611.

MASSELIN, J. N. (1939). Histologie de l'hypophyse de Crapauds soumis à l'obscurité et à la lumière.
C. R. Soc. Biol., *132*, 510-511.

MATTY, A. J. (1966). Endocrine glands in lower Vertebrates.
Internation. Rev. gen. exper. Zool., *2*, 43-138.

MAURER, F. (1888). Schilddrüsse, Thymus und Kiemenreste der Amphibien.
Morphol. Jahrb., *13*, 296-382.

Mc WHINNIE, D. J. & CORTELYOU, J. R. (1967). Parathyroid glands of Amphibians. II. Structural and biochemical changes in Amphibians tissues elicited by parathyroid hormone under varying conditions of season and temperature.
Amer. Zool., *7*, 857-868.

MEISENHEIMER, M. (1936). Die jahrescyclischen Veränderungen der Schilddrüsse von *Rana temporaria* L. und ihre Beziehungen zur Hautung.
Z. wiss. Zool., *148*, 261-197.

MEISNER, H. M. (1962). The effect of propylthiouracil on the oxygen consumption and iodine metabolism of the Frog, *Rana pipiens*, in winter.
Canad. J. Zool., *40*, 643-653.

METUZALS, J. (1951). Cytologische Studien über die Hypophysis cerebri des normalen und in der Dunkelheit gehaltenen Grasfrosches *(Rana temporaria* L.).
Z. Zellforsch., *35*, 550-578.

MICHOD, J., PLATSOUKAS, C. & FREI, J. (1969). Utilisation de microtubes héparinés pour recueillir le sang destiné à l'analyse chimique, en particulier au dosage du potassium.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem., *7*, 455-457.

MIDDLER, S. A., KLEEMAN, C. R. & EDWARDS, E. (1968). The role of the urinary bladder in salt and water metabolism of the Toad, *Bufo marinus*.
Comp. Biochem. Physiol., 26, 57-68.

MILLER, M. R. & ROBBINS, M. E. (1955). Cyclic changes in the pituitary gland of the urodele Amphibian, *Taricha torosa (Triturus torosus)*.
Anat. Rec., 122, 105-114.

MIRA-MOSER, F. (1969). Histophysiologie expérimentale de la fonction thyréotrope chez le Crapaud *Bufo bufo* L.
Arch. Anat. Histol. Embryol. norm. exper., 52, 87-182.

MIRA-MOSER, F. (1970). L'identification des cellules thyréotropes dans l'adénohypophyse du Crapaud *(Bufo bufo* L.*)*.
In : Micr. electron. 7e Congr. internation., Grenoble. 565-566, Soc. fr. Micr. electron., Paris.

MIRA-MOSER, F. (1971a). Action des goitrigènes sur le têtard de Crapaud : étude des modifications ultrastructurales de la *pars distalis* de l'hypophyse.
Sixth Conference of European Comparative Endocrinologists, 145.

MIRA-MOSER, F. (1971b). L'ultrastructure de l'adenohypophyse du Crapaud *Bufo bufo* L. II. Etude de l'évolution des cellules glycoprotidiques de type II après thyroïdectomie chirurgicale.
Z. Zellforsch., 112, 266-286.

MISHIMA, D. (1944). Developmental studies on the parathyroid gland of the Toad *(Bufo vulgaris formosus)*.
Acta. Anat. Nippon, 22, 168-182.

MONTSKO, T., BENEDECZKY, I. & TIGYI, A. (1963). Ultrastructure of the parathyroid gland in *Rana esculenta*.
Acta. Biol. Acad. Sci. hungar., 13, 379-388.

MONTSKO, T., TIGYi, A. BENEDECZKY, I. & LISSAK, K. (1963). Electron microscopy of parathyroid secretion in *Rana esculenta*.
Acta Biol. Sci. hungar., 14, 81-94.

MOORE, J. A. (1964). Physiology of the Amphibia.
654 pp., Academic Press, New-York.

MORGAN, A. H. & FALES, C. H. (1942). Seasonal conditions and effects of low temperature in the thyroid gland of Amphibians.
J. Morph., 71, 357-389.

MORGAN, A. H. & MAYER, E. K. (1936).
Anat. Rec., 64, 86-87. In : Comparative Endocrimology (von EULER et HELLER ed.), Academic Press, New-York.

MOSHKOW, E. A. (1971). Seasonal differences in the daily rhythm of the activity of the hypothalamo-thyroid complex in Ducks.
Sixth Conference of European Comparative Endocrinologists, 149.

OORDT, P. G. W. J. v. (1963). Cell types in the *pars distalis* of the Amphibian pituitary.
In : Cytologie de l'adenohypophyse. (J. BENOIT & C. DA LAGE ed.), 301-313, C. N. R. S., Paris.

OORDT, P. G. W. J. v. (1965). Nomenclature of the hormone producing cells in the adenohypophysis. A report of the international committee for nomenclature of the adenohypophysis.
Gen. Com. Endocrinol., 5, 131-134.

OORDT, P. G. W. J. v. (1966). Changes in the pituitary of the common Toad, *Bufo bufo* during metamorphosis and the identification of the thyrotropic cells.
Z. Zellforsch., 75, 47-56.

OORDT, P. G. W. J. v. (1968). The analysis and identification of the hormone producing cells of the adenohypophysis.
In : Perspectives in Endocrinology (BARRINGTON E. J. W. and B. JØRGENSEN ed.), 405-467, Academic Press, London.

OORDT, P. G. W. J. v., DONGEN, W. J. v. & LOFTS, B. (1968). Seasonal changes in endocrine organs of the male common Frog, *Rana temporaria*. I. The *pars distalis* of the adenohypophysis.
Z. Zellforsch., 88, 549-558.

ORTMAN, R. (1961). Anterior lobe of pituitary of *Rana pipiens*. I. A cytological and cytochemical study.
Gen. Comp. Endocrinol., 1, 306-316.

ORTMAN, R. & LANNEN, J. A. (1963). Bioassay data bearing of the localisation of thyrotrop cells in *Rana pipiens*.
Anat. Rec., 145, 268-269.

PASHKOVA, I. M. (1970).
In : Comparative physiology of thermoregulation (WHITTOW, ed.), 135-166, Academic Press, New-York.

PASTEELS, J. L. (1960). Etude expérimentale des différentes catégories d'éléments chromophiles de l'hypophyse adulte de *Pleurodeles waltlii*, de leur fonction et de leur contrôle par l'hypothalamus.
Arch. Biol. Belg., 71, 409-471.

PASTEELS, J. L. & HERLANT, M. (1960). Les différentes catégories de cellules chromophiles de l'hypophyse d'Amphibiens.
Anat. Anz., 109, 764-768.

PASTEELS, J. L. & HERLANT, M. (1962). Les différentes catégories de cellules chromophiles de l'hypophyse d'Amphibiens.
1er Congrès europ. Anat., 764-767, Fischer, Iena.

PEARSE, A. S. (1910). The reactions of Amphibians to light.
Proc. Amer. Ac. Arts. Sci., 10, 1-48.

PETERS, H. (1940). Morphologische und experimentelle Untersuchungen über die Epithelkörperchen bei Eidechsen.
Z. mikr. Anat. Forsch., 49, 1- 40

PFORDTE, K. & PONSOLD, W. (1967). Beitrag zur Analytik des Calciums im Blutserum.
Z. exp. Med. 144, 31-38.

PICKFORD, G. E. & ATZ, J. W. (1957).
The physiology of the pituitary gland of Fishes.
175 pp., New-York Zoological Society, New-York.

PILKINGTON, J. P. & SIMKISS, K. (1966). The mobilization of the calcium carbonate deposits in the endolymphatic sacs of metamorphosing Frogs.
J. exp. Biol., 45, 329-341.

PISANO, A. (1960). Caracteristicas histologicas y correlaciones endocrinas en la hipofisis, tiroidis y gonadas de *Pleurodema tucumana.*
Arqu. Bioquim. Quim. Farm., 8, 261-270.

PITT-RIVERS, R. & TATA, J. R. (1959). The thyroid hormones.
247 pp., Pergamon Press, London.

PITT-RIVERS, R. & TROTTER, W. R. (1964). The thyroid gland.
1, 453 pp., Butterworths, London.

PONSE, K. (1938). Histophysiologie de l'activation thyroïdienne.
Rev. suisse Zool., 45, 441-449.

PONSE, K. (1951). L'histophysiologie thyroïdienne.
Réunion des Endocrinologistes de langue française, 2-52, Masson-Doin, Paris.

REY, P. & TOUTAIN, J. (1971). Ovulation et valeurs hématocrites chez *Rana esculenta* L.
Sixth Conference of European Comparative Endocrinologists, *188*.

REYREL, F. (1967). Observations cytologiques sur l'hypophyse antérieure de *Pelobates cultripes* (Batracien Anoure).
C. R. Acad. Sci. 265, série D, 695-697.

RIZKALLA, W. (1969). Studies on Amphibians endocrines. The parathyroid gland of *Rana ridibunda*.
Acta veter. Acad. Sci. hungar., 18, 1-9.

ROBERTSON, D. R. (1968). The ultimobranchial body in *Rana pipiens*.
Z. Zellforsch., 85, 453-465.

ROBERTSON, D. R. (1969). The ultimobranchial body in *Rana pipiens*. IX. Effects of extirpation and transplantation on urinary calcium excretion.
Endocrinology, 84, 1174-1178.

ROBERTSON, D. R. (1970). The ultimobranchial body in *Rana pipiens*. Response to increased dietary calcium. Evidence of possible physiological function.
Endocrinology, 87, 1041-1050.

ROGERS, D. C. (1965). An electron microscope study of the parathyroid gland of the Frog *(Rana clamitans)*.
J. Ultrastruc. Res., 13, 478-499.

ROMEIS, B. (1926). Morphologische und experimentelle Studien über die Epithelkörper der Amphibien.
Z. Anat. Entwick., 80, 547-578.

ROMEIS, B. (1932). Taschenbuch der Mikroskopischen Technik.
784 pp., Oldenburg, München.

ROMEIS, B. (1940). Hypophyse.
In : Handbuch der Mikrosk. Anat. des Menschen (MOLLENDORF, ed.), 6, Springer, Berlin.

ROMEIS, B. (1948). Mikroscopische Technik.
452 pp., Leibniz, München.

ROSTAND, J. (1955). Les Crapauds - Les Grenouilles.
217 pp., Gallimard, Paris.

ROSTAND, J. (1971). Les étangs à monstres.
87 pp. Stock, Paris.

SALGUES, R. (1937). Les éléments de la phosphatémie normale chez les Amphibiens et les Reptiles.
C. R. Acad. Sci., 204, 524.

SAWYER, W. H. (1957). Increased renal reabsorption of osmotically free water by the Toad *(Bufo marinus)* in response to neurohypophysial hormones.
Amer. J. Physiol, 189, 564-566.

SCHEER, B. T. (1964).
In : Osmoregulation in Amphibia. (HELLER, H. ed.). Arch. Anat., micr. 54, 471-490.

SCHIRE, V. (1939a). Changes in plasma inorganic phosphate associated with endocrine activity in *Xenopus laevis*. II. The effect of insulin on hypophysectomized animals.
S. African J. Med. Sci., 4, 1-3.

SCHIRE, V. (1939b). Changes in plasma inorganic phosphate associated with endocrine activity in *Xenopus laevis*. III. Injection of adrenaline into normal and hypophysectomized animals.
S. African J. Med. Sci., 4, 4-8.

SCHIRE, V. (1941). Changes in plasma inorganic phosphate associated with endocrine activity in *Xenopus laevis*. IV. Injection of parathyroid extract into normal and hypophysectomized animals.
S. African J. Med. Sci., 6, 1-5.

SCHIRE, V. & ZWARENSTEIN, H. (1938). Changes in plasma inorganic phosphate associated with endocrine activity in *Xenopus laevis*. I. Extirpation of the pancreas and the pituitary and injection of insulin and anterior pituitary extract.
S. African J. Med. Sci., 3, 89-94.

SCHLUMBERGER, H. G. & BURK, D. H. (1953). Comparative study of the reaction to injury. II. Hypervitaminosis D in the Frog with special reference to the lime sacs.
Arch. Pathol., 56, 103-124.

SCHMID, W. D. (1965). Some aspects of the water economics of nine species of Amphibians.
Ecology, 46, 261-269.

SCHOFFENIELS, E. & TERCAFS, R. R. (1966). L'osmorégulation chez les Batraciens.
Ann. Soc. roy. Zool. Belg., 96, 23-39.

SCHOLZ, J. (1933). Morphologische Untersuchungen über die Epithelkörper der Urodelen.
Z. Mikroscop. Anat. Forsch., 34, 159-200.

SCHOLZ, J. (1935). Die Wirkung der Parathyreoidektomie bei Urodelen.
Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Organ., 132, 752-762.

SEHE, C. T. (1960). Radioautographic studies on the ultimobranchial body and thyroid gland in Vertebrates, Fishes and Amphibians.
Endocrinology, 67, 674-684.

SELLERS, E. A. & YOU, S. S. (1950). Role of the thyroid in metabolic responses to a cold environment.
Amer. J. Physiol., 163, 82-91.

SHAPIRO, H. A. (1933). The topography and histology of the parathyroid glandule in *Xenopus laevis*.
J. Anat., 68, 39-44.

SHAPIRO, H. A. & ZWARENSTEIN, H. (1933).
Metabolic changes associated with endocrine activity and the reproductive cycle *Xenopus laevis*. I. The effects of gonadectomy and hypophysectomy of the calcium content of the serum.
J. Exptl. Biol., 10, 186-195.

SHOEMAKER, V. H., Mc CLANAHAN, L. P. & RURBAL, R.(1969). Seasonal changes in body fluids in a field population of spadefoot Toads.
Copeia, 3, 585-591.

SICCARDI, G. & BRUTTINI, G. P. (1967). Microdeterminazione del volume percentuale dei globuli rossi centrifugati.
Haematol., Ital., 52, 393-400.

SIMMONS, D. J., Mc WHINNIE, D. J. & CUMMINS, H. (1971). Patterning of resorption in the cartilages from the long bones of Newts treated with parathyroid extract.
Experientia, 27, 826-828.

SKLOWER, A. (1925). Das insekretorische System im Lebenazyklus der Frösche (*Rana temporaria* L.) 1. Schilddrüse, Hypophyse, Thymus und Keindrüse.
Z. vergl. Physiol., 2, 474-523.

STARR, P. & RAWSON, R. W. (1937). A graphic representation of thyroid response to stimulation by thyrotropic hormone.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 35, 603-605.

STEIN, K. F. & CARPENTER, E. (1943). The effect of increased and decreased light on the thyroid gland of *Triturus viridescens.*
J. Morph., 72, 491-515.

STEWART, G. & BOWEN, H. (1951). The parathyroid control of serum calcium independent of renal mediation.
Endocrinology, 48, 568-575.

STEWART, J. W. (1966). A comparison of different methods of determinating the haematocrit.
Bibl. haematol., 24, 101-108.

STRAUB, J. & MEYER, B. (1961).
In : BRUN, J. & POZZETTO, H., La paix thérapeutique. La Revue du Praticien, 11, 2243-2249.

STUDITSKY, A. N. (1945). Function of parathyroid glands in Amphibia.
C. R. Acad. Sci., URSS, 97, 444-447.

STUTINSKY, S. (1939). Contribution à la physiologie hypophysaire des Batraciens. Les corrélations opto-pituito-mélanocytiques chez les Batraciens.
Thèse Med., Paris.

SUCH, G. (1968). Some aspects of the physiology of lymph hearts in the Frog.
Act. Physiol. Acad. Sci., Hung., 33, 413-419.

TALMAGE, R. V., DOTY, S. B. & YATES, C. W. (1962). The effect of temperature on the uptake of radioiodine by the thyroid gland of the Frog, *Rana pipiens.*
Gen. Comp. Endocrinol., 2, 266-272.

TALMAGE, R. V. & KRAINTZ, F. W. (1954). Immediate changes in phosphate excretion following parathyroidectomy in the Rat.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 85, 416-419.

TALMAGE, R. V., KRAINTZ, F. W. & BUCHANAN, G. (1955). Effect of parathyroid extract and phosphate salts on renal calcium and phosphate excretion after parathyroidectomy.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 88, 600-604.

TALMAGE, R. V., KRAINTZ, F. W., FRUST, R. & KRAINTZ, L. (1953). Evidence for a dual action of parathyroid extract in maintaining serum calcium and phosphate levels.
Endocrinol., *52*, *318-323*.

TALMAGE, R. V., WIMER, L. T. & TOFT, R. J. (1960). Additional evidence in support of the Mc-Lean's feedback mechanism of parathyroid action on bone.
Clin. Orthoped., *17*, *195-204*.

TAKACS, L. (1927). Herz und innere Sekretion.
Z. Ges. Exptl. Med., *57*, *514-526*.

THOMAS, O. L. (1944). A cytological study of the secretion antecedents of Rat thyroids activated by thiourea.
Anat. Rec., *89*, *461-473*.

THOMPSON, J. H. & HUXLEY, J. S. (1934). Retardation of growth in Axolotls resulting from parathyroid extract administration.
J. Exptl. Biol., *11*, *273-278*.

TIXIER-VIDAL, A. (1959). Données actuelles sur l'influence de la lumière sur l'activité thyroidienne des Vertébrés.
Ann. Endocrinol., *20*, *708-720*.

TOUTAIN, J. (1961). Sur une variante de la triple coloration de Prenant et son application à l'étude de la glande thyroïde.
Bull. Micr. appl., *(2)*, *11*, *97-98*.

TOUTAIN, J. (1962). Action de la thyroïdectomie et du froid sur les cellules thyréotropes de l'hypophyse antérieure de la Grenouille verte *(Rana esculenta* Linné*)*.
C. R. Acad. Sci., *254*, *3899-3900*.

TOUTAIN, J. (1966). Technique d'ablation de la glande thyroïde chez *Rana esculenta*, var. *hungarica*.
Bull. Soc. Linn. Norm., *7*, *180-181*.

TOUTAIN, J. (1969). Variations annuelles du volume érythrocytaire du sang de la Grenouille verte, *Rana esculenta* Linné.
J. Physiol., *61*, *418-419*.

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. (1943). Variations saisonnières de la structure cytologique de l'hypophyse de Triton palmé.
C. R. Soc. Biol., *137*, *30-31*.

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. (1945a). Variations saisonnières et répercussions de l'hypophysectomie sur la thyroïde du Triton alpestre.
Bull. histo. appl., 2, 17-25.

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. (1945b). Corrélations hypophyso-endocrines chez le Triton.
196 pp. Hermann, Paris.

UHLENHUTH, E. (1918). The antagonism between thymus and parathyroid glands.
J. Gen. Physiol., 1, 23-32.

UHLENHUTH, E. (1921). The internal secretions in growth and development of Amphibians.
Amer. Nat., 55, 193-221.

UHLENHUTH, E., SCHENTHAL, J. E., THOMPSON, J. J., MECH, F. F. & ALGIRE, G. H. (1945a). Colloid content and cell height as related to the secretory activity of the thyroid gland. I. In normal thyroids of *Triturus torosus*.
J. Morphol., 75, 1-29.

UHLENHUTH, E., SCHENTHAL, J. E., THOMPSON, J. J. & SWILLING, R. L. (1945b). Colloid content and cell height as related to the secretory activity of the thyroid gland. II. The activated thyroid of *Triturus torosus*.
J. Morphol., 76, 45-85.

URANGA, J. & QUINTANA, G. (1958). Absorcion de aqua en la vejiga del Sapo.
Rev. Soc. argent. Biol., 34, 75-81.

URIST, M. R. (1963). The regulation of calcium and other ions in the serums of Hagfish and Lampreys.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 109, 294-311.

VARELA, M. E., SELLARES, M. E. (1938). Variations annuelles du sang du Crapaud, *Bufo arenarum* Henkel.
C. R. Soc. Biol., 129, 1248-1249.

VOITKEVITCH, A. A. (1961). Le développement des extrémités surnuméraires chez les Amphibiens.
Bull. Biol. Fr. et Belg., 95, 569.

VULLINGS, H. B. G. (1971). Influence of light and darkness on the hypothalamo-hypophysial system of *Rana temporaria* L.
Z. Zellforsch., 113, 174-187.

WAGGENER, R. A. (1929). A histological study of the parathyroids in the Anura.
J. Morphol. Physiol., 48, 1-44.

WAGGENER, R. A. (1930). An experimental study of the parathyroids in the Anura.
J. Exptl. Zool., 57, 13-55.

WHITESIDE, B. (1922). The development of the *saccus endolymphaticus* in *Rana temporaria* Linné.
Amer. J. Anat., 30, 231-266.

WILAMOWSKI, K. (1968). Seasonal and temperature influenced changes in preoptic nucleus and neurohypophysis in *Bufo vulgaris*.
Fol. Biol., 16, 355-364.

WINTROBE, M. M. (1934). Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various Vertebrates.
Folia haematol., 51, 32-49.

WOLF, O. M. (1934).
Anat. Rec., 60, Suppl., 83. Abstr. In : Comparative Endocrinology (von EULER et HELLER ed.). Academic Press, New-York.

YAMADA, K. (1963). 2,2'-dihydroxy-6-6'dinaphthyl disulfide (DDD) diazo blue B reactive granules in the parathyroid glands of the Rat and Toad.
Experientia, 19, 487-488.

YOSHIDA, R. & TALMAGE, R. V. (1962). Removal of calcium from Frog bone by peritoneal lavage. A study of parathyroid function in Amphibians.
Gen. Comp. Endocrinol., 2, 551-557.

ZAMACHOWSKI, W. (1968). Changes in the water content in the organism of the common Frog (*Rana temporaria* L.) and the water Frog (*Rana esculenta* L.) in the annual cycle.
Acta Biol. Cracov., Zool., 11, 213-225.

ZHENEVSKAYA, R. P. (1948). Restoration of calcium content in parathyroidectomized Frogs.
Dokl. Akad. Nauk., 60, 533-535.

ZUBER-VOGELI, M. (1953). Histophysiologie de l'hypophyse de *Bufo vulgaris* L. *Arch. Anat. Histol. Embryol.*, 35, 77-180.

ZUBER-VOGELI, M. & HERLANT, M. (1964). Etude cytologique des formes cellulaires présentes dans l'antehypophyse de *Nectophrynoides occidentalis* Angel. *C. R. Acad. Sci.*, 258, 3367-3369.

ZWARENSTEIN, H. & SHAPIRO, H. A. (1933). Metabolic changes associated with endocrine activity and the reproductive cycle in *Xenopus laevis*. III. Changes in calcium content of the serum associated with capacity and the normal reproductive cycle. *J. Exptl. Biol.*, 10, 372-378.